

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Biosíntesis proteica en mitocondrias de cerebro de rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Gonzalo París Vicente

Madrid, 2015

TP
1984
167

Gonzalo París Vicente



* 5 3 0 9 8 6 6 8 4 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53-126809-2

BIOSINTESIS PROTEICA EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 167/84

© Gonzalo París Vicente

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984**

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-20268-1984

GONZALO PARIS VICENTE

"BIOSINTESIS PROTEICA EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA".

Dirigida por el Dr. Don Manuel José López Pérez.

Realizada en el DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Octubre de 1.980

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

"BIOSINTESIS PROTEICA EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA".

Memoria presentada por el Licencia
do GONZALO PARIS VICENTE para aspi
rar al grado de Doctor en Farmacia

MADRID - Octubre de 1.980

Este trabajo ha sido realizado integramen
te en el Departamento de Bioquímica de la
Facultad de Farmacia de la Universidad Com
plutense de Madrid, bajo la dirección del
Dr. D. Manuel José López Pérez, durante
los cursos 1977-78, 1978-79 y 1979-80, con
una Beca del Ministerio de Universidades
e Investigación para Formación de Perso
nal Investigador.

El capítulo correspondiente a la incorpo
ración "in vitro" de Leucina tritiada, se
efectuó en el Department of Biochemistry
and Chemistry, The Medical College of St.
Bartholomew's Hospital, London.

Merecen especial mención:

El Profesor D. Angel Santos Ruiz, por haberme acogido en su Departamento y facilitado los medios necesarios para la realización de este trabajo.

El Dr.D. Manuel José López Pérez, director de esta Tesis, por su amistad, ilusión y enseñanzas que han hecho posibles la realización de este Trabajo, y la iniciación en el campo de la investigación.

El Dr. John B. Clark, por facilitarme la estancia en su laboratorio, junto con las sugerencias y medios que puso a mi disposición.

El Dr. Stephen A.K. Harvey, por su colaboración y amistad.

El Dr. C. Larsson, por su colaboración en los métodos de partición en bifase y, en particular, por su cooperación en microscopía Electrónica.

El Dr. D. Javier Garzon, por sus sugerencias y cooperación durante la realización de este Trabajo y en particular, en lo referente a las técnicas de administración intraventricular.

El Dr. D. Rafael Rotger, por su colaboración en los controles microbiológicos.

A la Dra. Da. Ana María Pascual-Leone, por su colaboración en los experimentos con ratas tiroidectomizadas.

El Profesor D. José Luque, por su colaboración en el montaje de la técnica de partición en bifase.

El Dr. D. Ignacio Nuñez de Castro, por su cooperación en las medidas polarográficas de consumo de oxígeno.

A todos mis compañeros, personal técnico y auxiliar que han contribuido al desarrollo de mi labor.

A todos ellos manifiesto mi más profundo agradecimiento.

Parte de los trabajos aquí expuestos han sido presentados en la XVII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica, Madrid, 1978; y en el I Congreso Hispano-Portugues de Bioquímica de la reunión conjunta de la Sociedad Española de Bioquímica y Sociedad Portuguesa de Bioquímica , Coimbra, 1980.

..

A mis padres y a Rosa.

ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A.
AEE	Actividad Enzimática Específica.
ATP	Adenosin Trifosfato.
BSA	Seroalbumina de buey.
CAP	Cloranfenicol.
CH	Cicloheximida.
CoA	Coenzima A.
cpm	Cuentas por minuto.
DNA	Acido Desoxirribonucleico.
DNAasa	Desoxirribonucleasa.
DNP	Dinitrofenol.
DO	Densidad Óptica.
EDTA	Acido Etilen diamino tetraacético.
EDTA-K ⁺	Sal potásica del ácido etilen diamino tetraacético.
GABA	Acido gamma aminobutirato.
GTP	Guanosín trifosfato.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
mRNA	RNA mensajero.
NADH	Nicotinamido-adenin-dinucleotido reducido.
NADPH	Nicotinamido-adenin-dinucleotido fosfato reducido.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
P:O	Cociente Fósforo/oxígeno.
POPOP	1,4-bis-2-(4-metil-5-fenil oxazolil)-benzol.
PPO	2,5-difeniloxazol.
RCR	Cociente de control respiratorio.

RNA Acido Ribonucleico.
RNAasa Ribonucleasa.
rpm Revoluciones por minuto.
T₃ Triyodotironina.
TCA Acido Tricloroacético.
Tris Tris-hidroximetil-amino-metano.

ERRATAS

- Página 7, donde pone "Linnane y col", debe poner "Linnane y Haslam (1970)".
- Página 59, donde pone "dilución con agua destilada" debe poner "dilución con medio de aislamiento".
- Página 61, donde pone "Tris ClH pH 8,1" debe poner "Tris ClH 6 mM pH 8,1".
- Página 226, donde pone "Verity M.A., Brown W.J., Cheun M., y Czer G. (1977)" debe poner "Verity M.A., Brown W.J. Cheun M., y Czer G. (1977), J. Neurochem. 29, 673

I N D I C E

Página

1.- INTRODUCCION	1
2.- PARTE TEORICA	6
2.1.- SINTESIS PROTEICA MITOCONDRIAL	7
2.1.1.- Características de la síntesis protei ca mitocondrial	7
2.1.2.- Ribosomas mitocondriales	7
2.1.3.- Polisomas mitocondriales	8
2.1.4.- Origen de las proteínas mitocondriales	9
2.1.5.- Síntesis de proteínas específicas por mitocondrias	12
2.1.5.1.- Citocromo c Oxidasa	15
2.1.5.2.- Complejo ATPasa sensible a la oligomicina	16
2.1.5.3.- Citocromo b	17
2.1.6.- Transporte de proteínas a la mitocon- dria	17
2.1.7.- Ensamblaje de la mitocondria	18
2.1.8.- Regulación del genoma nuclear por la mitocondria	20
2.2.- MITOCONDRIA DE CEREBRO	21
2.2.1.- Métodos de obtención	21

	Página
2.2.2.- Variaciones citológicas y regionales.	23
2.2.3.- Evolución de las mitocondrias con la edad	24
2.2.4.- Propiedades respiratorias	25
2.2.5.- Contenido enzimático	26
2.3.- SINAPTOSOMAS	28
2.3.1.- Consumo de oxígeno y metabolismo de glucosa	28
2.3.2.- Producción de metabolitos por el si- naptosoma	29
2.3.3.- Efecto de la despolarización sobre los sinaptosomas	30
2.4.- METABOLISMO DE MACROMOLECULAS DE LA REGION SI- NAPTICA	33
2.4.1.- Transporte axoplásmico	33
2.4.2.- Transporte axoplásmico de RNA	36
2.4.3.- Síntesis proteica en el sinaptosoma .	36
2.4.4.- Glucosilación de proteínas por las fracciones sinápticas	39
2.5.- SINTESIS PROTEICA POR LA MITOCONDRIA DE CERE- BRO	42
2.5.1.- Aspectos generales	42
2.5.2.- Condiciones de incubación "in vitro".	43

	Página
2.5.3.- Características de la síntesis proteica de mitocondrias de cerebro	44
2.5.4.- Síntesis proteica mitocondrial durante el desarrollo	46
3.- MATERIAL Y METODOS	48
3.1.- MATERIAL	49
3.1.1.- Animales utilizados	49
3.2.- PRODUCTOS Y APARATOS	50
3.2.1.- Productos	50
3.2.2.- Isótopos	50
3.2.3.- Aparatos utilizados	50
3.3.- METODO	53
3.3.1.- Esterilización del material	53
3.3.2.- Métodos de aislamiento	53
3.3.2.1.- Aislamiento de mitocondrias por gradiente discontinuo de sacarosa	53
3.3.2.2.- Aislamiento de mitocondrias por gradiente de Ficoll ...	56
3.3.2.3.- Aislamiento de mitocondrias libres y sinaptosomas por partición en sistemas bifásicos	61

	Página
3.3.2.4.- Purificación de mitocondrias libres y sinápticas de FicoII por partición en sistemas bi fásicos	65
3.3.3.- Determinación de actividades enzimáti- cas	65
3.3.3.1.- Actividad citocromo c oxida- sa	65
3.3.3.2.- Actividad de la lactato des- hidrogenasa	66
3.3.3.3.- Actividad acetilcolinestera- sa	66
3.3.3.4.- Actividad citrato sintasa ..	66
3.3.3.5.- Actividad NADPH citocromo c oxidoreductasa	67
3.3.3.6.- Actividad fumarasa	67
3.3.3.7.- Actividad succinato deshidro- genasa	67
3.3.3.8.- Determinación de proteínas .	67
3.3.4.- Actividad respiratoria	68
3.3.5.- Espectro de citocromos a 25° C	68
3.3.6.- Determinación de ácidos nucleicos	69
3.3.6.1.- Extracción de ácidos nucleí- cos	69

	Página
3.3.6.2.- Estimación cuantitativa de RNA y DNA	69
3.3.7.- Incorporación de ^3H -Leucina en cortes de cerebro	70
3.3.7.1.- Preparación de cortes	70
3.3.7.2.- Incubación de los cortes ..	70
3.3.7.3.- Medida de la radioactividad	71
3.3.8.- Experimentos "in vivo"	72
3.3.8.1.- Técnica para la inyección intracerebroventricular en la rata sin anestesia	72
3.3.8.2.- Aislamiento de fracciones mitocondriales	73
3.3.8.3.- Medida de la radioactividad	73
3.3.9.- Experimentos "in vitro"	73
3.3.9.1.- Incorporación de ^3H -Leucina en mitocondrias obtenidas por Ficoll	73
3.3.9.2.- Incorporación de ^{14}C -Leuci- na en mitocondrias obtenidas por Ficoll	74
3.3.9.3.- Determinación de radioacti- vidad	74
3.3.9.4.- Control de contaminación bac- teriana	75

	Página
3.3.10.- Microscopía electrónica	75
4.- RESULTADOS	76
4.1.- EXPERIENCIAS "IN VIVO"	77
4.1.1.- Caracterización de mitocondrias <u>aisla</u> das por gradiente discontinuo de <u>saca</u> rosa	77
4.1.1.1.- Actividades enzimáticas ...	77
4.1.1.2.- Espectro de citocromos	81
4.1.1.3.- Respiración	84
4.1.1.4.- Determinaciones de RNA y DNA	86
4.1.2.- Incorporación de Leucina tritiada en cortes de cerebro	88
4.1.3.- Experimentos "in vivo"	91
4.1.3.1.- Estudio de la incorporación del isótopo a lo largo del proceso	91
4.1.3.2.- Incorporación "in vivo" de Leucina tritiada en mitocon dria libre y sináptica en función del tiempo	91
4.1.3.3.- Efecto de la concentración de Leucina en la incorpora ción	93
4.1.3.4.- Experimentos de pulso-caza	93

	Página
4.1.3.5.- Efecto de antibióticos en la incorporación	97
4.1.3.6.- Inhibidores del transporte axoplásmico	105
4.2.- EXPERIENCIAS "IN VITRO"	108
4.2.1.- Mitocondrias "Clark and Nicklas"	108
4.2.1.1.- Caracterización de la frac- ción de mitocondrias "Clark and Nicklas"	108
4.2.1.2.- Incorporación "in vitro" de leucina tritiada en mitocon- drias "Clark and Nicklas"...	108
4.2.2.- Mitocondrias libres y sinápticas aisla- das por gradiente discontinuo de Ficoll	115
4.2.2.1.- Estudio enzimático a lo lar- go del fraccionamiento por gradiente discontinuo de Fi- coll	115
4.2.2.2.- Ensayos respiratorios en mi- tocondrias libres y sinápti- cas	118
4.2.2.3.- Incorporación "in vitro" de leucina tritiada en mitocon- drias libres y sinápticas ais- ladas por gradiente disconti- nuo de Ficoll	123

	Página
4.2.2.4.- Incorporación de ^{14}C -Leucina en mitocondrias libres y sinápticas obtenidas por <u>gradiente</u> discontinuo de Ficoll	132
4.2.2.4.1.- Efecto del tiempo, concentración de leucina y <u>antibióticos</u>	132
4.2.2.4.2.- Incorporación de ^{14}C -Leucina en presencia de <u>distintos</u> sustratos	141
4.2.2.4.3.- Efecto de la <u>tironina</u> y <u>fenobarbital</u> en la incorporación	144
4.2.2.4.4.- Experimentos en ratas <u>tiroidectomizadas</u>	146
4.2.3.- Mitocondrias aisladas por bifase	149
4.2.3.1.- Utilidad de los sistemas <u>biofísicos</u> para el aislamiento de mitocondrias y <u>sinaptosomas</u>	150
4.2.3.1.1.- Determinaciones enzimáticas ...	150

Página

4.2.3.1.2.- Ensayo respirato rio	151
4.2.3.1.3.- Microscopía Elec trónica	157
4.2.3.2.- Mitocondrias libres y sináp- ticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll y pos- terior purificación por bifa se	162
4.2.3.2.1.- Determinaciones enzimáticas	162
4.2.3.2.2.- Incorporación de ¹⁴ C-Leucina	164
5.- DISCUSION	166
5.1.- EXPERIENCIAS "IN VIVO"	167
5.1.1.- Utilidad de los gradientes discontinuos de sacarosa para la separación de mito condrias libres y sinápticas	167
5.1.1.1.- Estudio enzimático en el frag cionamiento por gradiente dis continuo de sacarosa	167
5.1.1.2.- Caracterización de mitocon- drias libres y sinápticas ob tenidas por gradientes dis- continuos de sacarosa	168

	Página
5.1.2.- Incorporación de ^3H -L-Leucina	171
5.1.2.1.- Estudios en cortes de cere- bro	171
5.1.2.2.- Incorporación "in vivo" de ^3H -Leucina	172
5.1.2.3.- Experimentos de pulso-caza..	175
5.1.2.4.- Efecto de la cicloheximida y cloranfenicol en la biosínte- sis proteica mitocondrial ..	176
5.2.- Estudios de incorporación "in vitro"	179
5.2.1.- Utilidad de los gradientes de Ficoll...	179
5.2.1.1.- Mitocondrias "Clark and Nic- klas "	179
5.2.1.2.- Mitocondrias libres y sinápt- ticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll	181
5.2.1.3.- Incorporación "in vitro" de ^3H -Leucina por mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll	183
5.2.1.4.- Incorporación "in vitro" de ^{14}C -L-Leucina en mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll	186

	Página
5.3.- Mitochondrias aisladas por bifase	192
5.3.1.- Utilidad de los sistemas bifásicos ...	192
5.3.2.- Caracterización de mitochondrias libres y sinaptosomas aislados por bifase ...	194
5.4.- Mitochondrias libres y sinápticas aisladas por gradientes discontinuos de Ficoll y purifica- dos por bifase	199
5.4.1.- Determinaciones enzimáticas	199
5.4.2.- Incorporación de ¹⁴ C Leucina	200
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	201
7.- BIBLIOGRAFIA	206

1.- INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

Son varias las razones por las que las mitocondrias de cerebro ofrecen unas características que las diferencian del resto de las mitocondrias de otros órganos animales y, en general, de las de todos los organismos vivos. En primer lugar, su función respiratoria aporta la energía necesaria para el mantenimiento de la función celular más específica del sistema nervioso: la neurotransmisión. De aquí que las mitocondrias de cerebro hayan adaptado su función respiratoria a los procesos altamente endergónicos que mantienen el potencial de membrana. Desarrollan diversos mecanismos que los interrelacionan y regulan mutuamente, aunque su base molecular más íntima sea en muchas ocasiones poco conocida. Por otro lado, la peculiar estructura neuronal plantea problemas de morfogénesis mitocondrial muy particulares. El gran cuerpo celular es el lugar donde mayoritariamente se realiza el metabolismo neuronal. Sin embargo, la lejanía de la terminación nerviosa, prácticamente carente de sistemas biogénéticos, obliga a mantener un transporte axoplásmico activo encargado del mantenimiento de la arquitectura de la terminación nerviosa. Y en esta arquitectura sináptica las mitocondrias ocupan un lugar funcional insustituible, y tienen que ser mantenidas, asimismo, en su recambio molecular por el soma celular mediante el transporte axoplásmico.

Aparentemente, una panorámica de tal complejidad funcional y citológica haría pensar que el estudio de estos procesos por métodos bioquímicos convencionales sería inabordable, y que sólo las técnicas citoquímicas permitirían diferenciar y estudiar ambas poblaciones mitocondriales - las somáticas y las

sinápticas - separadamente. Sin embargo, Gray, Whittaker y De Robertis, al principio de la década de los sesenta, hicieron una observación experimental de gran trascendencia para la metodología neuroquímica. En efecto, estos autores comprobaron que la terminación nerviosa sufre un proceso de reanillamiento durante la homogenización del tejido que da lugar a una partícula artefactual, el sinaptosoma, en cuyo interior se engloban las mitocondrias sinápticas. Este hecho ha permitido el desarrollo de una gran variedad de técnicas que permiten separar mitocondrias libres, sinaptosomas, membranas sinápticas y mitocondrias sinápticas.

En la presente Memoria doctoral, se aborda el estudio y caracterización de la biosíntesis proteica mitocondrial que es el fenómeno que mantiene su propia biogénesis y que, en definitiva, es decisivo en el mantenimiento de la propia función cerebral. Sin embargo, este estudio debía realizarse desde una doble perspectiva para dar una visión lo más integrada posible del fenómeno. En primer lugar, las peculiaridades de la neurogénesis hace imposible estudiar aspectos de la misma - como es el caso del transporte axoplásmico - si no es mediante una metodología que utilice incorporaciones de precursores, bien en cortes de tejido o "in vivo". Se han descrito en la literatura científica diversos trabajos de precursores "in vivo" o en cortes de cerebro, que se han abordado con el fin exclusivo de determinar la vida media de las mitocondrias. Tal tipo de estudio exige pulsos de larga duración en donde la cinética de dilución del marcado es la base experimental. Por el contrario, nuestro objetivo ha sido diferente puesto que la cinética de incorporación del precursor era lo que nos interesaba, lo que requiere,

por tanto, pulsos más cortos donde se puedan observar posibles fenómenos de transporte. En segundo lugar, el singular comportamiento genético mitocondrial, con todos los elementos necesarios para llevar a cabo una biosíntesis proteica autónoma, permite caracterizar este fenómeno "in vitro" e intentar diferenciarlo en las poblaciones mitocondriales libres y sinápticas. Tal diferenciación no había sido realizada con anterioridad, ni establecido una correlación entre esta capacidad biosintética y la utilización de diferentes sustratos energéticos.

Unos planteamientos como los anteriormente expuestos nos han conducido a una cuestión técnica subyacente, consistente en matizar si toda la metodología existente de separación de mitocondrias y sinaptosomas de cerebro podía ser valorada conjuntamente, prescindiendo de los objetivos experimentales de partida. Ha sido una preocupación permanente en nuestro quehacer la discusión de los métodos de obtención de mitocondrias de cerebro existentes en la actualidad y en base a nuestros propios resultados experimentales. Los métodos alternativos han sido seleccionados mediante criterios de reproducibilidad, funcionalidad, pureza o compartimentación. Por otra parte, debido a que la pureza de las mejores preparaciones descritas en la literatura podían ofrecer ciertas dudas, sobre su grado de pureza, se ha abordado finalmente un método de purificación por bifase que brinda la posibilidad de obtener mitocondrias prácticamente carentes de contaminación.

Paralelamente a los objetivos citados, una serie de cuestiones menores, pero que han surgido inmediatamente como consecuencia del desarrollo del tema, han sido abordadas también.

Nos referimos a aspectos tales como el efecto de la edad, de algunos fármacos, e incluso de hormonas sobre la biosíntesis proteica de mitocondrias de cerebro. Tales cuestiones han sido tratadas más con el ánimo de abrir nuevas vías de investigación que con el de dar ahora respuestas concluyentes a los interrogantes planteados.

2.- PARTE TEORICA

2.- PARTE TEORICA

2.1.- SINTESIS PROTEICA MITOCONDRIAL

2.1.1.- Características de la síntesis proteica mitocondrial

Los elementos implicados en la síntesis proteica mitocondrial, tales como el tRNA y los ribosomas son distintos de los homólogos citoplásmicos.

La síntesis es inhibida por cloranfenicol, lincomicina y eritromicina, mostrando resistencia a RNAasa y cicloheximida (Ibrahim y col., 1974).

La iniciación se realiza con la incorporación de formil-metionina, dato que junto a su respuesta a los inhibidores, ha sugerido que el sistema mitocondrial tiene semejanza con el sistema biosintético de procariontes. A su vez se ha comprobado como los factores de elongación de los dos sistemas son intercambiables.

Hay que destacar que la significación de la síntesis proteica mitocondrial no es superior al 10 % de sus propias proteínas (Mahler y cols., 1972).

2.1.2.- Ribosomas mitocondriales

Los ribosomas mitocondriales se han localizado estrechamente asociados con la membrana interna mitocondrial (Vignais y col., 1972), este dato juntamente con las observaciones de resistencia a determinados antibióticos "in vivo" pero no "in vitro" ha llevado a Linnane y col. a proponer una disposi-

ción especial entre membrana y ribosomas capaz de impartir las características especiales a los ribosomas mitocondriales (Linane y Haslam, 1970; Mitchell y col., 1973; Bunn y col., 1970; Dixon y col., 1971). Estas propiedades especiales pueden ser el resultado de la naturaleza hidrofóbica de los péptidos producidos (Ojala y Attardi, 1972; Michel y Neupert, 1973) sugiriendo encontrarse en el interior de la membrana para poder realizar la síntesis.

2.1.3.- Polisomas mitocondriales

Hay evidencias de la existencia de ribosomas formando polisomas, no obstante también se han encontrado resultados contradictorios. La presencia de polisomas tiene importancia ya que la síntesis convencional de proteínas de peso molecular elevado implica grandes moléculas de RNA mensajero y por lo tanto la presencia de polisomas, mientras que la síntesis de péptidos de bajo peso molecular, que posteriormente se ensamblan en proteínas mayores, requerirían RNA mensajeros pequeños, siendo suficientes como unidades sintéticas los monosomas. En cortes de secciones finas de Candida utilis, se han apreciado alineamientos de 6 a 12 ribosomas (Vignais y col., 1972) unidos por un hilo que pudiese ser de RNA mensajero. En levadura (Mahler y col., 1972; Mahler y Dawidowicz, 1973; Coopers y Avers, 1974) y en Euglena gracilis (Avadhani y Buetow, 1972 a, b) se han identificado polisomas, siendo convertidos por la acción de RNAasa en monosomas, sugiriendo que los ribosomas estaban mantenidos por RNA mensajero. No obstante los polisomas de mitocondria de Neurospora, no son disociados por la acción de RNAasa (Michel y Neupert, 1973), suponiendo que estos ribosomas están unidos por

otras estructuras aparte del RNA, pudiendo ser el resultado de las interacciones hidrofóbicas entre los polipéptidos que se es tan sintetizando.

Se ha comprobado como los polisomas son activos tanto en la iniciación como en la elongación, pues incorporan activamente formiato (iniciación) y leucina (elongación).

2.1.4.- Origen de las proteínas mitocondriales

El papel de la biosíntesis proteica mitocondrial se podría fijar por la disponibilidad de la mitocondria para sintetizar proteínas "in vitro". No obstante esta capacidad está mucho más limitada que "in vivo" (Ashwell y Work, 1970). La baja relación de síntesis impone la necesidad de eliminar la posible contaminación bacteriana. También el hecho de sacar a la mitocondria de su entorno supone eliminar importantes factores reguladores y de mantenimiento. A pesar de estos inconvenientes los trabajos de Coote y Work (1971), Lederman y Attardi (1973) demostraron que los productos formados "in vitro" correspondían y eran comparables con los sintetizados "in vivo", resultando la gran objeción de esta técnica la baja relación de síntesis.

De gran interés ha resultado el hallazgo de los mutantes "Petite" de levadura, pues al ser incapaces de realizar biosíntesis proteica mitocondrial (Schatz y Saltzgeber 1969) y poseer mitocondrias (aunque modificadas), las proteínas presentes en sus orgánulos, seran de origen citoplásmico, pudiendo estudiar el papel de la síntesis proteica citoplásmica en las proteínas mitocondriales.

Otro punto decisivo, ha sido el empleo de inhibidores específicos de la biosíntesis proteica mitocondrial, cloranfenicol, eritromicina (Lamb y col., 1968), o de la citoplásmica, cicloheximida (So y Davie, 1968). Hay que tener en cuenta que estos inhibidores son específicos para levadura, pero no suelen ser tan efectivos y específicos en otras células (Ibrahim y col., 1974).

De lo anteriormente expuesto se deduce que una proteína se considerará mitocondrial si no se encuentra en los mutantes "petites" y si su síntesis es bloqueada en la cepa de levadura salvaje por inhibidores de la síntesis proteica mitocondrial y no por los inhibidores de la citoplásmica, a su vez esta proteína deberá ser sintetizada por la mitocondria aislada en condiciones "in vitro". Inversamente la proteína que se encuentre presente en los mutantes "petites" y las mutaciones que afecten a la proteína se transmitan por genes cromosómicos, juntamente con el bloqueo de su síntesis por inhibidores de la biosíntesis citoplásmica y no por los mitocondriales se identifica el origen como no mitocondrial (Schartz y Mason, 1974).

El empleo de pulsos "in vivo" en presencia de inhibidores apropiados, con posterior eliminación del mismo resulta una técnica muy apropiada para determinar el lugar de síntesis. A su vez este sistema produce las mínimas interferencias en las interacciones citoplasma-mitocondria.

Se ha comprobado sin lugar a dudas, que la mitocondria sintetiza algunas de sus propias proteínas, que están codificadas en el DNA mitocondrial. De los estudios desarrollados con inhibidores se sabe que del 85 al 95 % de la proteína

mitocondrial total se sintetiza en el citoplasma (Henson y col. 1968; Hawley y Greenawalt, 1970; Schatz y col., 1972) valor que coincide con el deducido de los estudios de incorporación de formilo que alcanzaron un valor máximo del 10 % (Feldman y Mahler, 1974). Así se ha descrito que la mayoría de los componentes de la matriz (Roodyn, 1962), membrana externa (Neupert y col., 1967 Beattie, 1967 b), membrana interna (Henson y col., 1968; Schatz y col., 1972), juntamente con las proteínas que constituyen la maquinaria adecuada para la transcripción y traducción (Subik y col., 1970), son codificadas por el núcleo y sintetizadas en el citoplasma.

Las células tratadas con cloranfenicol o eritromicina exhiben una deficiencia en los citocromos a , a_3 , b y c_1 , sugiriendo al menos una parcial dependencia mitocondrial. No se han encontrado variaciones en el contenido de citocromo c , fumarasa ó malato deshidrogenasa ó en enzimas fácilmente solubles (Clark-Walker y Linnane, 1966, 1967; Kronn y Jansen, 1968; Huang y col., 1964; Evans y Lloyd, 1967; Firkin y Linnane, 1968). En los mutantes "petites" también han desaparecido los citocromos a , a_3 , b , c_1 , pero contienen citocromo c , fumarasa, aconitasa y enzimas fácilmente solubles (Sager, 1972).

En los mutantes "petites" se encuentra el sistema F_1 (ATPasa), (Schatz, 1968), no obstante difiere del sistema ATPasa de la cepa salvaje, ya que es oligomocina resistente lo que supone que algún componente del sistema falta o está alterado.

Debido a que gran parte de las proteínas son sintetizadas en el citoplasma y codificadas por el núcleo, se ha

comprobado como mutaciones cromosómicas producen deficiencias respiratorias en levadura y Neurospora (Pittman, 1959; Sherman y Slonimski, 1964).

Se ha aportado recientemente la observación de ribosomas citoplásmicos unidos a la membrana externa mitocondrial en S. cerevisiae (Kellems, y col., 1974) y levadura (Keyhani, 1973), Rhodoturula rubra (Keyhani, 1973) y en Dictostylium cerevisiae (Cotter y col., 1969). En S. cerevisiae estos ribosomas corresponden a 80S y permanecen ligados a las membranas mitocondriales durante el proceso de aislamiento de las mitocondrias (Kellems y Butow, 1972). Esta unión se ha comprobado que no es artefactual, ya que en condiciones de bloqueo de la unión a la mitocondria no varió la proporción de los que se encontraron ligados a la membrana mitocondrial (Kellems y Butow, 1974). Sin embargo, estos mismos autores han comprobado como se producía una variación en la proporción de los ribosomas unidos a la membrana mitocondrial en distintos estados fisiológicos, así como "in vitro" eran capaces de sintetizar proteínas de las que una parte eran cedidas a la mitocondria (Kellems y col., 1974).

2.1.5.- Síntesis de proteínas específicas por la mitocondria

Aunque el papel de la traducción mitocondrial es cuantitativamente poco significativo, cualitativamente ha resultado ser muy importante ya que tanto el transporte electrónico como la fosforilación oxidativa no se realizan cuando falta alguna de las proteínas sintetizadas por la mitocondria (Tzagoloff y col., 1973; Schatz y Mason, 1974). Se ha estimado que el 20 % de la proteína mitocondrial sintetizada corresponde a com-

ponentes de citocromo c oxidasa (Ebner y col., 1973).

La determinación de las proteínas sintetizadas por la mitocondria se ha estudiado marcando a las células de Neurospora o levadura estando bloqueada la traducción citoplásmica por cicloheximida (Schatz y Saltzgaber, 1969). Otro importante factor es el desarrollo de la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS que permite separar proteínas insolubles y fraccionarlas en función de su magnitud molecular (Shapiro y col. 1967; Weber y Osborn, 1969). De los resultados obtenidos en diversos organismos se ha encontrado grandes semejanzas en Neurospora, levadura, Hígado y células Hela (Coote y Work, 1971; Groot y col., 1971; Schatz y col., 1972; Weislogel y Butow, 1971; Thomas y Williamson, 1971; Brega y Baglioni, 1971; Galper y Darnell, 1971; Lederman y Attardi, 1973; Lansman y col., 1974), habiéndose obtenido de 5 a 10 fracciones de pesos moleculares comprendidos entre 1000 y 95000.

El estudio de la naturaleza de los productos sintetizados por la mitocondria puede estar sujeto a una serie de factores que pueden inducir a errores artefactuales. Así las proteínas pueden ser degradadas por la acción de proteasas (Pringle, 1970) o bien estas proteínas pueden agregarse dando unidades de peso molecular mayor dada su alta hidrofobicidad. La degradación de proteasas queda inhibida por el uso de metilsulfonilfenilfluoruro (Lansman, 1974). La agregación es difícil de prevenir, conduciendo a confusión a cerca de la unidad polipeptídica mitocondrial básica. En cuanto a los experimentos de pulso-caza tienen el inconveniente de la accesibilidad de la leucina a la mitocondria a pesar de las altas concentraciones exter-

nas (Lansman y col., 1974).

Se ha hablado de la posibilidad de que uno o varios péptidos de bajo peso molecular se comporten como precursores de las proteínas mitocondriales, de esta manera estos precursores se unirían a unidades de peso molecular mayor (Tzagaloff y col., 1972; Michel y Neupert, 1973). Otra hipótesis mantiene que existiría un número relativamente pequeño de proteínas codificadas por la mitocondria que funcionarían como unidades necesarias para el ensamblaje de las proteínas funcionales sintetizadas en el citoplasma (Tzagaloff y col., 1972). Esta última suposición choca con el caso del citocromo b, que es sintetizado por la mitocondria, o con citocromo c oxidasa, ya que se han encontrado anticuerpos específicos y distintos para los diferentes péptidos de la misma sintetizados por la mitocondria, comprobando a su vez como cada uno de ellos era capaz de inhibir la actividad del complejo (Poyton y Scharz, 1975 b). A pesar de estas observaciones existen evidencias que apoyan las dos teorías.

Se ha encontrado evidencia de la presencia de un polipéptido de bajo peso molecular como precursor en Neurospora, ya que en experimentos de marcado con leucina tritiada en presencia de cicloheximida, aparecieron unos productos con pesos moleculares de 5000 a 10000 a tiempos cortos de pulsos, apareciendo en mayor espacio de tiempo péptidos de mayor peso molecular, 20000 a 40000, comprobando como en pulsos largos, la radioactividad se localizaba fundamentalmente en la fracción de mayor magnitud molecular. De estos experimentos se desprende que productos de bajo peso molecular son primeramente sintetizados por la mitocondria y posteriormente ensamblados en moléculas mayo-

res (Michel y Neupert, 1973). No obstante también se ha detectado la existencia de un péptido de bajo peso molecular, 7800, en levadura formando una estructura polimérica de peso molecular de 45.000 (Tzagoloff y Akai, 1972).

Aunque es muy posible que precursores de bajo peso molecular sean responsables de la formación de proteínas mitocondriales de mayor magnitud molecular, los productos finales sintetizados no son semejantes, como se ha demostrado por la distinta composición en aminoácidos de los péptidos de citocromo c oxidasa sintetizados en presencia de cicloheximida (Tzagoloff, 1974; Poyton y Schartz, 1975 a) o del componente de ATPasa (Tzagoloff y col., 1974). Así mismo los anticuerpos obtenidos para cada unidad de citocromo c oxidasa son totalmente específicos (Werner, 1974 a, b).

Como ya se ha expuesto los enzimas mitocondriales que requieren síntesis proteica mitocondrial son citocromo c oxidasa, ATPasa rutamicín sensible, citocromo b y algunos componentes del sistema transportador de nucleótidos de adenina.

2.1.5.1.- Citocromo c Oxidasa

La citocromo c oxidasa de levadura está constituida por siete polipéptidos (Tzagoloff y col., 1974; Poyton y Schatz, 1975 a). Después de numerosos esfuerzos se ha llegado a la deducción de que tres polipéptidos son sintetizados por la mitocondria, siendo los de mayor peso molecular del complejo, los restantes provienen del citoplasma. Las unidades sintetizadas en la mitocondria son necesarias para el ensamblaje de los péptidos codificados en el núcleo y análogamente los componentes

citoplásmicos son necesarios para el ensamblaje de los sintetizados por la mitocondria. Existe desacuerdo a cerca de la procedencia del péptido transportador del grupo hemo, postulando un origen citoplásmico (Schatz y col., 1972; Mason y col., 1973) o mitocondrial (Tzagoloff y col., 1974).

2.1.5.2.- Complejo ATPasa sensible a la oligomicina

El complejo está formado por 10 péptidos en levadura y está constituido por una fracción de ATPasa soluble (F_1) constituida por 5 péptidos y una proteína relacionada con la unión de F_1 a la membrana y que a su vez confiere la sensibilidad de la ATPasa a oligomicina (OSCP). Otra lipoproteína de membrana que posee 4 péptidos completa el sistema, ésta lipoproteína ayuda a la unión del complejo con la membrana y posiblemente esté también relacionada con la sensibilidad a oligomicina (Shannon y col., 1973).

Tanto F_1 como OSCP son sintetizadas por el sistema citoplásmico (Tzagoloff, 1969 y 1970). Cuando las células de levadura se crecen en presencia de cicloheximida la radioactividad se incorporaba en componentes del complejo ATPasa que precipitaban con los anticuerpos obtenidos del mismo, determinándose posteriormente que correspondían con los anticuerpos producidos por las 4 subunidades de la lipoproteína relacionada con la unión del sistema con la membrana (Tzagoloff y Meagher, 1972), deduciendo que la síntesis de las mismas se realizaría en la mitocondria.

A pesar de la síntesis de F_1 y OSCP cuando las células se crecieron en presencia de cloranfenicol, el ensamblaje

je no se efectuó, indicándose la necesidad de algun factor mitocondrial.

2.1.5.3.- Citocromo b

Existe numerosas formas del citocromo b en las distintas especies, lo que ha originado numerosas discusiones debido a esta multiplicidad (Slater, 1973; Wikstrom, 1973). En Neurospora la incorporación es insensible a cicloheximida mostrando sensibilidad a cloranfenicol, lo que supone que su origen es mitocondrial.

2.1.6.- Transporte de proteínas a la mitocondria

El hecho de que no exista un método adecuado para su estudio ha impedido por el momento una respuesta exacta, constituyendo actualmente uno de los problemas centrales de la biogénesis de la mitocondria. Se ha comprobado como tras la administración "in vivo" de aminoácidos marcados a ratas y posterior obtención de su fracción microsomal, cuando ésta fracción se mezclaba con mitocondrias de ratas no tratadas "in vitro" aparecían proteínas marcadas en las mismas, lo que sugiere una cesión de las proteínas sintetizadas por los microsomas a las mitocondrias.

Entre las diversas teorías a cerca del transporte de las proteínas se ha sugerido que éstas formasen complejos de fosfolípidos (Kadenbach, 1966). El hecho conocido de que ciertas proteínas de la membrana se unan a fosfolípidos con gran especificidad podría ayudar a explicar esta hipótesis. A su vez estos complejos de fosfolípidos no encontrarían dificultad pa-

ra pasar las membranas mitocondriales. De todas maneras no existen pruebas experimentales suficientes que puedan comprobarlo.

Ya se ha comentado en las secciones anteriores que en levadura se ha detectado la presencia de ribosomas 80S unidos a la membrana externa mitocondrial, pudiendo considerar esta asociación similar a la encontrada en el retículo endoplásmico, de tal manera que sintetizarían proteínas y las exportarían a la mitocondria.

2.1.7.- Ensamblaje de la mitocondria

La proteína mitocondrial depende de dos sistemas biosintéticos. Unas proteínas son sintetizadas en el citoplasma usando un RNA mensajero nuclear y otras se sintetizan por el sistema mitocondrial usando RNA mensajeros mitocondriales. Los dos sistemas están conectados de modo que una interferencia en cualquiera de ellos afecta al otro.

Las proteínas sintetizadas por la mitocondria son fundamentalmente péptidos insolubles de la membrana (Roodyn 1962) que corresponden a la membrana interna mitocondrial (Neupert y col., 1967; Beattie, 1967 b), siendo el resto de las proteínas de procedencia citoplásmica. Como ya se ha comentado en la sección anterior, el mecanismo de ensamblaje de la mitocondria se desconoce por el momento.

Anteriormente al conocimiento de la existencia del DNA mitocondrial y de su sistema biosintético de proteínas se pensaba que la mitocondria se originaría por un proceso de evaginación o invaginación de la membrana celular. Posteriormente

te tras los descubrimientos citados se consideró que tenía un grado de autonomía suficiente que garantizara su continuidad de generación en generación. Esta suposición estaba avalada por las observaciones de Manton, quien comprobó como en el flagelado unicelular Chromulina, que poseía una sola mitocondria, sufría el proceso de fisión binario durante el ciclo de división celular. Desgraciadamente este hecho no se observa tan fácilmente en el resto de los organismos.

Un experimento que aportó ideas aclaratorias respecto a este problema fue el realizado por Luck en Neurospora crasa. Obtuvo mutantes que requerían el aporte de colina para poder crecer (la colina es necesaria para la síntesis de los fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial) y se cultivaron en presencia de colina tritiada, posteriormente las células se cambiaron a un medio con colina fría y se desarrollaron por espacio de tres generaciones al cabo de las cuales las células se fragmentaron aislándose la fracción de mitocondrias y se determinó su radioactividad, comprobando como siempre aparecía marcada esta fracción subcelular. Luck dedujo que las mitocondrias sintetizadas de "novo" provenían de las ya preexistentes siendo esta la razón por la cual siempre obtuvo radioactividad en las mitocondrias (Whittaker y Dank, 1978).

En resumen parece que la nueva estructura mitocondrial (al menos la membrana interna) se logra por adición de los componentes mitocondriales nuevamente sintetizados a la mitocondria preexistente. A su vez también se ha establecido que la invariabilidad de la mitocondria formada se debe a un proceso de división que será más o menos preciso dependiendo del organismo o tejido considerado (Whittaker y Dank, 1978).

2.1.8.- Regulación del genoma nuclear por la mitocondria

Las interacciones directas entre los péptidos sin tetizados en la mitocondria juntamente con los procedentes del citoplasma determinan el ensamblaje final de la mitocondria. No obstante hay evidencias considerables y con apoyo experimental fuerte que sugieren un control por parte de la mitocondria sobre las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma y codificadas en el DNA nuclear. Algunos de los enzimas codificados en el núcleo y sintetizados por el sistema citoplásmico parecen estar inducidos cuando la biosíntesis proteica mitocondrial está bloqueada por antibióticos adecuados. Estos datos su gieren que la mitocondria produce un represor que bloquea la ex presión de los genes nucleares (Tedeschi, 1976).

2.2.- MITOCONDRIA DE CEREBRO

2.2.1.- Métodos de obtención

Debido a la complejidad estructural del cerebro, juntamente con su alto contenido en lípidos, los estudios realizados con fracciones particuladas aisladas de sus homogenados ha conducido durante mucho tiempo a atribuir propiedades especiales a determinadas fracciones, comprobando posteriormente que se debieron a partículas contaminantes por la ausencia de una metodología apropiada para separar los distintos componentes subcelulares.

Uno de los mayores avances en el entendimiento de la bioquímica cerebral, fue el hallazgo por Gray y Whitaker (1962) y De Robertis (1962) de la existencia en la fracción del crudo mitocondrial de homogenados de cerebro de la presencia de unas partículas, cuya morfología se asemejaba a la terminación nerviosa y que denominaron sinaptosomas. Posteriormente se comprobó que efectivamente correspondían a esta porción de la célula. Su formación se debe a las propiedades estructurales de la membrana celular, ya que tras la homogenización en .sacarosa 0,32 M, la membrana una vez rota, es capaz de volverse a unir albergando en su interior a todos los componentes de la terminación nerviosa, encontrándose por lo tanto mitocondrias sinápticas, vesículas y todos los constituyentes citoplásmicos que se encontraban presentes en el momento de la homogenización. A partir de este descubrimiento, el crudo mitocondrial se fraccionó en sus distintos componentes pudiéndose separar las mitocondrias del cuerpo de la neurona del sinaptosoma y posteriormente lisar éste y aislar las mitocondrias sinápticas.

Desde estos hallazgos se ha realizado un gran esfuerzo para disponer de una serie de técnicas que proporcionen fracciones subcelulares no sólo bien separadas, sino lo más puras y con la mayor funcionalidad posible. El tema ha sido ampliamente estudiado y así Jöbsis (1963) y Ozawa (1966) han citado 19 y 26 métodos diferentes para el aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata, intentando lograr una alta pureza y un buen estado metabólico.

En general todos los métodos están basados en una separación de los componentes del crudo mitocondrial por centrifugación de gradientes continuos o discontinuos del mismo. El gradiente discontinuo de sacarosa fue desarrollado por Gray y Whitaker (1962), siendo ampliamente utilizado actualmente. Otros gradientes frecuentemente empleados son los isotónicos de polímeros de alto peso molecular de Ficoll, como los desarrollados por Kurokawa y col. (1965), Abdel-Latif (1966), Autilio y col. (1968), Cotman y col. (1971), Morgan y col. (1972), Cotman y Mathews (1971), Lai y Clark (1976), Booth y Clark (1978). También se han empleado gradientes de CsCl, como los desarrollados por Kornguth y col. (1969) (1971), y Levitan y col. (1972). No obstante el empleo de gradientes suele requerir el empleo de altas fuerzas centrífugas que pueden alterar la integridad de los orgánulos, por ello se han propuesto métodos que requieren bajas fuerzas de centrifugación y cortos periodos de tiempo como el descrito por Clark y Nicklas (1970), empleando gradientes de Ficoll a bajas concentraciones o el desarrollado por Bernard y Cockrell (1979) basado en lavados sucesivos con soluciones salinas.

En las siguientes secciones se hace un estudio

detallado del empleo de tres técnicas preparativas, dos de ellas basadas en la utilización de gradientes discontinuos de sacarosa y de Ficoll, y en la última se aporta un nuevo procedimiento basado en el empleo de sistemas bifásicos de polímeros de alto peso molecular.

2.2.2.- Variaciones citológicas y regionales

El cerebro se considera como uno de los tejidos más ricos en el contenido de mitocondrias, así el 15 % de la proteína total del cerebro es de naturaleza mitocondrial. A su vez representa el 25 % de la proteína de la sustancia gris (Abood, 1970).

La estructura y morfología de la mitocondria en cerebro varía significativamente entre los distintos tipos celulares, en las distintas partes de una misma célula y entre las distintas áreas del sistema nervioso (Palay y Palade, 1955; Sotelo y Palay, 1968; Mugnaini y Walberg, 1964).

En cuanto al contenido se ha encontrado el máximo en la terminación nerviosa. Entre las células neurales y gliales se ha apreciado una mayor proporción en las primeras. A su vez de los distintos tipos de células gliales el mayor contenido corresponde a oligodendrocitos siguiendo a continuación los astrocitos y la microglía (Tewari y col., 1973).

Por consideraciones en el microscopio electrónico se han encontrado variaciones entre las mitocondrias de células gliales y neurales de ratas adultas, diferenciándose en la estructura, clase y concentración, así el número de crestas de

la mitocondria de célula neural es superior al encontrado en astrocitos y oligodendrocitos (Pysh y Khan, 1972), sugiriendo Guiffride y Gadaleta (1978), que los distintos tipos de células en el sistema nervioso central difieren en su disponibilidad para realizar la fosforilación oxidativa.

Al encontrar estas diferencias entre las distintas clases de células se pensó que la mitocondria de oligodendroglía y de la célula de Schwann estarían selectivamente relacionadas con la síntesis de proteínas de las vainas de mielina, mientras que la mitocondria de la terminación nerviosa (mitocondria sináptica) podría participar en la formación de proteínas axonales de la membrana sináptica, así como en la de péptidos con función en la neurotransmisión. No obstante a pesar de los muchos esfuerzos encaminados a encontrar estas diferencias, variaciones funcionales de esta naturaleza no han podido ser demostradas con las diversas poblaciones mitocondriales obtenidas de diferentes áreas de cerebro ni de las distintas poblaciones aisladas de una misma célula (Sidney, 1971).

2.2.3.- Evolución de las mitocondrias con la edad

La población de mitocondrias en cerebro aumenta rápidamente con el desarrollo, alcanzando a los 21 días en rata un valor cuatro veces superior al encontrado al primer día de vida (Samson y col., 1960).

De los distintos estudios morfológicos desarrollados también se sugiere que las concentraciones de los enzimas del ciclo de Krebs de la matriz, así como los relacionados con las cadenas de transporte y asociados con el complejo ATPasa

aumentan con el desarrollo (Pysh, 1970). También se ha descrito que las actividades succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa aumentan con la maduración postnatal (Gregson y Williams, 1969; Friede, 1969; Weiner, 1960).

Se han observado cambios en la fracción de vesículas sinápticas modificándose su volumen con una evolución paralela a las curvas de crecimiento de la fracción mitocondrial, sugiriéndose que las modificaciones de la mitocondria estan relacionadas con el aumento del número de las vesículas sinápticas (Pysh, 1970). De acuerdo con esta hipótesis también se ha encontrado un importante aumento durante la maduración neonatal de la actividad enzimática ATPasa sodio-potasio dependiente en el cerebro de rata (Samson y Quin, 1967), que juega un papel fundamental en la función sináptica.

2.2.4.- Propiedades respiratorias

Una de las características más sobresaliente del tejido cerebral es su alto consumo de oxígeno, destacándose la alta capacidad respiratoria de la mitocondria de este tejido. Una propiedad específica y selectiva de la mitocondria de cerebro es el estímulo respiratorio que experimenta cuando en el medio de respiración existe una alta concentración del ión potasio. Este efecto del potasio se ha observado con la mayoría de los sustratos respiratorios y fue descrito por Kini y Quastel (1959), Ozawa y col. (1967) y Clark y Nicklas (1970). También se comprobó un aumento en los valores respiratorios por la adición de valinomicina (Clark y Nicklas, 1970), antibiótico que favorece la acumulación de potasio en la mitocondria (Harris y

col., 1966). Se han formulado distintas hipótesis para explicar este efecto del potasio, así se ha sugerido que se debe a una estimulación directa sobre el sistema de transporte electrónico (Kini y Quastel, 1959). También se ha pensado que se deba a un efecto estimulador sobre la actividad ATPasa sodio-potasio dependiente, lo que originaría un aumento de los niveles de ADP, lo que provocaría un estímulo sobre la respiración mitocondrial. A su vez Clark y Nicklas (1970), propusieron que el efecto se podría explicar por un aumento en la disponibilidad de los sustratos para su oxidación. El efecto del potasio alcanza los valores máximos cuando se usa como sustrato respiratorio el piruvato y malato conjuntamente, explicándose por el estímulo del ión potasio sobre el complejo piruvato deshidrogenasa, ayudado por la formación de oxalacetato a partir de malato (Linn y col. 1969; Wieland y Siess, 1970). Recientemente Bernard y Cockrell (1979) han relacionado el estímulo respiratorio de potasio por una interacción con el gradiente electroquímico de protones.

Otro ión que ha presentado interacciones con los valores respiratorios es el cation divalente magnesio, así cuando las mitocondrias de cerebro de rata se incuban con medios de respiración con magnesio, se observa una disminución en el estado IV, así como en los RCR (Moore y Jöbsis, 1970).

2.2.5.- Contenido enzimático

Las mitocondrias de cerebro, difieren de las de otros tejidos por contener concentraciones importantes de los denominados enzimas "no mitocondriales". Así se ha descrito la presencia de Hexoquinasa, creatín quinasa y quizás lactato des-

hidrogenasa. La función de hexoquinasa y creatín quinasa sería transferir el fosfato cargado de energía del ATP a glucosa o a creatina, lográndose unos niveles elevados de ADP localmente , que estimularía la actividad respiratoria de la mitocondria y podría a su vez explicar el alto consumo de oxígeno por el cerebro (Abood, 1970; Bradford, 1968; Lehninger, 1970; Mc Ilwain y Bachelard, 1971 b; Moore y Jöbsis, 1970).

2.3.- SINAPTOSOMAS

Como se ha descrito anteriormente, tras la homogenización de cerebro en sacarosa 0,32 M, se formaban unas partículas denominadas por Whittaker sinaptosomas. El sinaptosoma engloba en su interior a todas las partículas de la terminación sináptica, mitocondrias, vesículas, juntamente con los constituyentes citoplásmicos separados del exterior por la membrana sináptica. Esta membrana es continua como se desprende de las observaciones realizadas por microscopía electrónica, y permanece intacta siendo capaz de responder a los cambios osmóticos del medio exterior. A su vez el sinaptosoma consume oxígeno linealmente durante horas en presencia de diferentes sustratos (Bradford, 1967, 1969), que supone la existencia de actividad metabólica por estas preparaciones.

2.3.1.- Consumo de oxígeno y metabolismo de glucosa

La incubación de los sinaptosomas en presencia de glucosa alcanza unos valores respiratorios comparables e incluso superiores a los obtenidos con cortes de tejido corticales (Bradford, 1969; Whittaker, 1969; Balfour y Gilbert, 1970), deduciéndose que los sinaptosomas mantienen el sistema glucolítico activo y bien organizado, supliendo a la mitocondria sináptica el aporte suficiente de piruvato para mantener el consumo lineal de oxígeno durante un periodo mínimo de tres horas.

La presencia de sodio en estas preparaciones en concentraciones superiores a 70 mM produce un estímulo en el consumo de glucosa que puede llegar a ser del doble de los va-

lores controles. Este efecto ha sido inhibido por EDTA, ouabaina, oligomicina y atractilósido, deduciendo que la estimulación glucolítica del sodio se debe a un aumento de los niveles internos de ADP por estimulación de la actividad ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dependiente, enzima localizado en la membrana del sinaptosoma, ya que para eliminar el sodio que ha penetrado del exterior se necesita una gran actividad de ATPasa. De estas observaciones se deduce que los sinaptosomas mantienen intacta su membrana y que en el interior del sinaptosoma las concentraciones de sodio son bajas debido a la acción del sistema ATPasa (Bradford, 1971; Verity, 1972; Diamond y Fishman, 1973). A su vez también se ha observado como la ausencia de sodio causó una serie de modificaciones, ya que junto a una baja actividad respiratoria y escasa producción de ATP se encontró en el medio de incubación un aumento en los niveles de aminoácidos como glutamina, serina, glicina, alanina y particularmente de GABA, explicándose por el requerimiento del ión sodio para el transporte de los aminoácidos (Lahiri y Lajtha, 1964; De Belleruche y Bradford, 1972).

La ausencia de calcio del medio de incubación supone un aumento en la actividad respiratoria y glucolítica del 30 % debido a que este ión modifica la permeabilidad de la membrana facilitando la entrada del ión sodio al sinaptosoma, lo que desencadenará el mecanismo anteriormente expuesto (Bradford y col., 1973).

2.3.2.- Producción de metabolitos por el sinaptosoma

La incubación de los sinaptosomas en la presencia de glucosa supone un acúmulo de ATP, potasio y fosfocreati

na (De Belleruche y Bradford, 1972). La producción de sustratos tales como piruvato, malato, y glutamato permiten alcanzar altos valores respiratorios, superando de esta manera el efecto limitante de la glucólisis (Verity, 1972). Estos resultados juntamente con el efecto acelerador de la respiración por la adición de agentes desacoplantes al medio de incubación (Diamond y Fishman, 1973; Verity, 1972) y el control respiratorio del ADP sobre los sinaptosomas así como sobre las mitocondrias sinápticas aisladas, demuestra que en el sinaptosoma se desarrollan la secuencia completa de reacciones metabólicas desde la entrada de glucosa a través de la membrana hasta la producción de CO_2 y agua con un alto acoplamiento de la mitocondria sináptica obteniendo un cociente P:O de 3 para glutamato y de 2 para succinato como sustratos (Verity, 1972). A su vez de las determinaciones del contenido de potasio en el interior de los sinaptosomas se ha deducido que estas partículas mantienen el potencial de membrana (Bradford, 1971).

2.3.3.- Efecto de la despolarización sobre los sinaptosomas

Tanto en la despolarización química producida por las altas concentraciones de potasio en el medio de incubación, como en la física producida por impulsos eléctricos, se ha observado un aumento en el metabolismo, estimulándose la actividad respiratoria y glucolítica, juntamente con la liberación de transmisores (Bradford, 1970 b).

La despolarización originada por impulsos eléctricos ha producido una pérdida en el contenido de potasio en el sinaptosoma, así como un aumento de los niveles de sodio. Es

te aumento de sodio sería la primera causa de la estimulación en la actividad respiratoria y glucolítica por acelerar y activar la bomba de sodio-potasio.

En las despolarizaciones realizadas por las altas concentraciones de potasio se ha comprobado una entrada del catión calcio, produciéndose a su vez la liberación de sustancias neurodinámicas y de aminoácidos.

Tras la despolarización química o eléctrica se produce la liberación de aminoácidos al medio de incubación, de los 18 aminoácidos encontrados, hay que destacar preferentemente aspartato, glutamato y GABA, que son los mayoritariamente liberados. En este proceso es totalmente necesaria la presencia de calcio en el medio de incubación para que el proceso de liberación tenga lugar.

Los sinaptosomas aislados de distintas áreas del cerebro constituyen una preparación metabólicamente activa para estudiar la síntesis, almacenaje y liberación de las distintas aminas biógenas. Así De Belleruche y col. (1975), Glowinski y Iversen (1966), De Belleruche y Bradford (1975) han estudiado estos aspectos con norepinefrina, serotonina y dopamina.

Otra de las posibilidades que ofrece el sinaptosoma es el constituir un buen sistema para estudiar el efecto de numerosas drogas sobre su metabolismo, Horn y col. (1971) han estudiado el efecto de numerosas drogas sobre el consumo de catecolaminas por preparaciones de sinaptosomas de hipotálamo y cuerpo estriado. También Gfeller y col. (1971), han encontrado una inhibición en el consumo de serotonina, noradrenalina y do-

pamina por el efecto de agentes antiparkinsonianos, antihistamínicos, antidepresores tricíclicos y fenotiazínicos en preparaciones de sinaptosomas de hipocampo y cuerpo estriado.

Utilizando sinaptosomas de cerebro completo, Kan nengiesser y col. (1973), encontró que la clorpromacina y amitriptilina (antidepresores), provocan una inhibición en el consumo de serotonina. Este mismo resultado se ha obtenido empleando ouabaina y oligomicina (inhibidores de ATPasa) por White y Keen (1971), estos efectos también se han encontrado con anfetaminas y amantidina (Thornburg y Moore, 1973).

La acetilcolina también se libera de los sinaptosomas cuando se someten a despolarización por efecto del potasio o por impulsos eléctricos (De Belleruche y Bradford, 1972 b) siendo las cantidades encontradas del mismo orden que con otros transmisores como GABA y glutamato (De Belleruche y Bradford, 1972 a).

Otro aspecto muy interesante ha sido la identificación tanto en su contenido como en su liberación de agentes hormonales en preparaciones de sinaptosomas de distintas áreas del cerebro (Mulder, 1970; Bradford, 1970a). Este aspecto metabólico ofrece la oportunidad de investigar aspectos celulares y bioquímicos de los procesos de liberación de sustancias neurosecretoras y la forma en que son moduladas por factores humorales tales como hormonas y neurotransmisores.

2.4.- METABOLISMO DE MACROMOLECULAS DE LA REGION SINAPTICA

Para poder entablar comunicación con células distantes, las neuronas han desarrollado las prolongaciones dendríticas y axónicas. Ya que las terminaciones nerviosas se encuentran alejadas del cuerpo de la neurona la comunicación entre ambas partes requiere un sistema de transporte de macromoléculas. Las dendritas al igual que el cuerpo de la neurona, poseen ribosomas y sintetizan proteínas a partir de RNA mensajero nuclear. No obstante, los áxones y las terminaciones nerviosas no contienen ribosomas morfológicamente identificables. Aunque existe una gran dependencia del sistema biosintético del cuerpo de la neurona, se ha propuesto a su vez que la terminación nerviosa tiene capacidad para sintetizar proteínas.

2.4.1.- Transporte axoplásmico

Se ha establecido con toda evidencia que las proteínas destinadas a la terminación nerviosa son sintetizadas fundamentalmente por el cuerpo celular y posteriormente transportadas a través del axón.

Dos tipos de experimentos han sido utilizados para demostrar la existencia del transporte axoplásmico. Por una parte se observó que tras la ligazón de un nervio, se producía un acúmulo de determinados enzimas en las regiones próximas a la constricción del nervio. El otro tipo, ha sido la presencia de proteínas marcadas en segmentos del axón cada vez más separados del cuerpo de la neurona, tras la aplicación en el mismo de aminoácidos marcados (Mc Ewen y Grafstein, 1968; Fibiger y col ., 1972). Otro dato que apoyó el transporte fue el encontrar pro-

teinas marcadas en la terminación nerviosa tras la administración intraventricular de aminoácidos marcados (Barondes, 1964, y 1968).

De estos estudios se ha deducido la existencia de dos tipos de transporte, uno rápido que alcanza varios cientos de mm por día y otro lento de varios mm por día (Barondes, 1964; Grafstein, 1969; Lasek, 1970; Fibiger y col., 1972). Este transporte no es exclusivo del axón, habiéndose observado a su vez en las dendritas (Schubert y col., 1971).

Por el transporte rápido se transporta fundamentalmente material particulado y glicoproteínas (Mc Ewen y Grafstein, 1968; Zatz y Barondes, 1971; Karlsson y Sjostrand, 1971; Mc Ewen y col., 1971). El componente lento transporta cinco veces más material que el componente rápido y de ese material el 60 % es proteína particulada y el 40 % es proteína soluble (Mc Ewen y col., 1971) siendo tubulina (Feit y col., 1971) la proteína soluble mayormente transportada, así mismo se ha comprobado el transporte de las mitocondrias (Jeffrey y col., 1972).

La inhibición de la síntesis proteica no bloquea el transporte (Peterson y col., 1967; Mc Ewen y Grafstein, 1971). A su vez la aplicación de inhibidores del metabolismo energético al axón produjo una inhibición del transporte (Mc Ewen y Grafstein, 1963) indicando que el sistema de transporte es dependiente del aporte de energía y que se localiza en el axón. El transporte es inhibido por colchicina y vinblastina (Dahlstron, 1968; Kreutzberg, 1969; Fernandez y col., 1970, 1971), deduciéndose la integridad de los microtúbulos para la realización del transporte. También se ha encontrado la existencia de un trans-

porte retrógrado de la terminación nerviosa al cuerpo de la neurona (Kristenson y col., 1971; La Vail y La Vail, 1972).

No se han identificado a todas las proteínas transportadas, no obstante se conoce que determinadas hormonas hipotalámicas son segregadas por las terminaciones nerviosas. También se han encontrado proteínas marcadas en el espacio sináptico postulándose la existencia de un transporte a través de la membrana sináptica, no obstante no está totalmente evidenciado si estas proteínas son transportadas a través de la sinapsis o son proteínas de degradación de la terminación nerviosa (Grafstein, 1971).

La rapidez del transporte exoplásmico en su componente rápido ha llevado a atribuirle gran importancia en la regulación de la función neural, ya que las proteínas pueden alcanzar la terminación nerviosa en solo unos minutos.

El mecanismo de transporte axoplásmico no está perfectamente conocido, no obstante para el componente rápido se han planteado dos modelos. Ambos están basados en el empleo de proteínas contráctiles, actina y miosina, juntamente con los microtúbulos. El primer modelo postulado por Weis, supone que los materiales se desplazan pasivamente entre los elementos micro-trabeculares del axoplasma. El movimiento se produciría por peristalsis (ondas de contracción) o por cilios que estarían generados por proteínas contractiles. Los microtúbulos y las proteinas citoesquelóticas serían necesarias para sostener la configuración adecuada de los canales o para fijar los cilios.

En el otro modelo propuesto por Scharz (1980) ,

un componente fibrilar continuo del axoplasma proporciona carriles de desplazamiento esencialmente estáticos y pasivos en los que los orgánulos se desplazan de forma gradual. El movimiento en cada carril sería monodireccional y requeriría aporte de energía. Ochs (1972) propuso un mecanismo para este transporte que requiere microtúbulos y filamentos compuestos por proteínas contractiles. El orgánulo se une al filamento y al microtúbulo, al contraerse el filamento, por una concentración semejante a la producida en el complejo actinmiosina del músculo, se acorta y el orgánulo se desplazaría a lo largo de los microtúbulos.

2.4.2.- Transporte axoplásmico de RNA

El transporte de RNA ha despertado un gran interés, ya que significaría la posibilidad de síntesis proteica en el axón y la terminación nerviosa (Austin y col., 1966; Peterson y col., 1968; Casola y col., 1969; Bondy, 1971; Autilio-Gambetti y col., 1970). Se han encontrado una serie de datos que podrían sugerir este transporte, ya que cuando se aplican precursores marcados en regiones ricas en cuerpos celulares, RNA radioactivo se encuentra en los nervios, también se ha comprobado como los nucleótidos migran desde su punto de aplicación, no obstante, el RNA marcado no migra de una manera discreta y continua como ocurre en las proteínas. A su vez es muy difícil distinguir el transporte de RNA por el axón del RNA incorporado por las células gliales periaxiales (Autilio - Gambetti y col. 1973).

2.4.3.- Síntesis proteica en el sinaptosoma

Las preparaciones de sinaptosomas obtenidas por

distintos procedimientos han mostrado capacidad para incorporar aminoácidos en proteínas (Morgan y Austin, 1968, 1969; Gordon y Deanin, 1968; Appel y col., 1969; Bosman y Hemsworth, 1970; Bridgers y col., 1971; Hernandez y col., 1971; Goldberg, 1971; Gambetti y col., 1972; Gilbert, 1972; Morgan, 1970; Cotman y Taylor, 1971; Larry y col., 1975; Hernandez y col., 1976; Ramirez y col., 1972; Hernandez y col., 1978; Tewari y col., 1978; Gurd 1978; Verity y col., 1977; Autilio y col., 1968). La dificultad para estudiar la síntesis proteica en la fracción de sinaptosomas surge de la contaminación existente en esta fracción, debida no solo a mitocondrias libres sino también a unas partículas que poseen en su interior ribosomas y se encuentran recubiertas por membranas (Morgan, 1970), siendo ambos susceptibles de incorporar aminoácidos en proteínas "in vitro". Uno de los aspectos de la síntesis proteica más estudiado ha sido el efecto de antibióticos sobre la incorporación, utilizándose inhibidores específicos del sistema biosintético citoplásmico (cicloheximida) y mitocondrial (cloranfenicol). No obstante los datos aportados han mostrado gran variación, así Gordon y Deanin (1968) y Gilbert (1972) encontraron una inhibición total por cicloheximida, mientras Ramirez y col. (1972) encontró este mismo resultado con cloranfenicol. A pesar de estos datos extremos en la mayoría de los estudios realizados la síntesis proteica por sinaptosomas está inhibida del 70 - 80 % por cicloheximida, lo que supone que los ribosomas 80S estan implicados en el proceso y del 20 - 30 % es inhibido por cloranfenicol, lo que sugiere la existencia de síntesis proteica mitocondrial.

Para distinguir la síntesis proteica del sinaptosoma de la producida por los contaminantes se ha estudiado el

efecto de RNAasa y de la concentración iónica del medio (Appel y col., 1969). No obstante tanto la mitocondria como las partículas descritas por Morgan son insensibles a RNAasa y la modificación de las condiciones iónicas del medio pueden afectar al sinaptosoma como se ha expuesto en las secciones anteriores.

Dos estrategias distintas se han empleado a su vez: la electromicroscopía autoradiográfica y el estudio de los productos sintetizados por el sinaptosoma, mitocondria y microsoma.

De los estudios de electromicroscopía autoradiográfica el 50 % de la radioactividad se ha encontrado localizada en estructuras membranosas que poseían ribosomas en su interior (Gambetti y col., 1972; Cotman y Taylor, 1971), el 20 % está asociado con la mitocondria sináptica (Gambetti y col., 1972) distribuyéndose el resto entre el sinaptosoma y la membrana sináptica, deduciéndose que el sinaptosoma es capaz de sintetizar proteínas por un mecanismo diferente, además de la síntesis proteica debida a la mitocondria intrasinaptosomal.

De los estudios comparativos de los productos sintetizados por sinaptosomas y mitocondrias se ha encontrado que los péptidos sintetizados por cada fracción son diferentes, de lo que se deduce que existe otro mecanismo en el sinaptosoma que sintetiza proteínas (Gilbert, 1972; Ramírez y col., 1972).

También se han realizado estos estudios con fracciones de membranas sinápticas de alta pureza (Ramírez y col., 1972; Levitan y col., 1972), encontrando que la incorporación era inhibida en un 90 % por cloranfenicol, lo que descartaría

una contribución de ribosomas 80S. Por este mismo procedimiento, Ramírez (1973), ha comprobado por experimentos "in vivo" una inhibición por cloranfenicol. A su vez los productos sintetizados por estas membranas sinápticas no han mostrado similitudes con los de mitocondrias, lo que excluye la contaminación de mitocondrias en estas preparaciones. De estos resultados los autores concluyen que la membrana sináptica posee un sistema capaz de biosintetizar proteínas con características similares al sistema mitocondrial, aunque sus productos son diferentes. Se ha sugerido que la mitocondria en la terminación nerviosa ceda su sistema biosintético, el cual se incorporaría a la membrana sináptica (Barondes, 1974). No obstante no se han obtenido evidencias de la exportación de ribosomas por parte de la mitocondria (Attardi y Attardi, 1968), por ello esta hipótesis resulta difícil de aceptar (Barondes, 1974). A su vez Gambetti y col. (1972) Hernández y col. (1976), (1978), y Autilio y col. (1968) han obtenido inhibiciones del 30 % aproximadamente por efecto del CAP que contrasta con el 90 % aportado por Ramírez y col. (1972) . De los estudios más recientes se apoya la posibilidad de que el sinaptosoma incorpora aminoácidos a través de un sistema no mitocondrial aunque hay que presentar fuertes evidencias para descartar la contribución debida a los contaminantes (Barondes , 1974).

2.4.4.- Glucosilación de proteínas por las fracciones sinápti- ces

La adición covalente de distintos residuos a proteinas puede ser un mecanismo adecuado para modular la función sináptica. Los azúcares se incorporan a las proteínas una vez

que han dejado los ribosomas, existiendo evidencias que sugieren que a nivel de retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi (Winzler, 1970), y en membranas celulares (Roth y col., 1971) se produce la glicosilación. Se ha realizado un gran esfuerzo para determinar si en la terminación nerviosa se produce también. Para su estudio se han empleado técnicas "in vitro" e "in vivo".

En los estudios realizados "in vivo" (Bosmann, 1972; Dutton y col., 1973; Zatz, 1971; Gurd, 1978), se administran azúcares marcados intracerebralmente determinándose a distintos tiempos la radioactividad de las proteínas de la terminación nerviosa. Por el empleo de esta técnica se han obtenido evidencias de la incorporación de glucosamina en proteínas de la terminación nerviosa (Dutton y col., 1973). No obstante la interpretación de los estudios realizados "in vivo" resulta difícil, ya que es posible la contaminación de esta fracción por retículo endoplásmico o Golgi. En cuanto a los intentos realizados con fucosa, hay muy pocas evidencias que confirmen su incorporación (Zatz y Barondes, 1971). A su vez también se han desarrollado experimentos "in vitro" de glicosilación con sinaptosomas aislados (Reith y col., 1972; Mariani y col., 1972), existiendo así mismo el problema de la posible contaminación con retículo endoplásmico o Golgi, no obstante fracciones altamente purificadas han incorporado glucosamina en glucoproteínas (Fegtoff y col., 1971). Después de la incorporación, los sinaptosomas se han lisado y se han fraccionado sus componentes a través de gradientes, apareciendo una proporción importante de radioactividad asociada con la fracción enriquecida en mitocondrias, sugiriendo que la glicosilación encontrada en la fracción de sinaptosomas se efectuase en la mitocondria sináptica (Dutton y

col., 1973). A su vez se ha descrito la existencia de glicoproteínas (Itoh y col., 1974; Martiny Bosmann, 1971) asociadas con la membrana externa e interna mitocondrial (Itoh y col., 1974). También se ha descrito la presencia del enzima manosil transferasa asociada a la membrana interna mitocondrial, sugiriendo que la mitocondria sería susceptible de glicosilar proteínas (Morelis y col., 1974).

2.5.- SINTESIS PROTEICA POR LA MITOCONDRIA DE CEREBRO

2.5.1.- Aspectos generales

Se ha comprobado como la mitocondria de cerebro purificada posee todos los componentes esenciales para la síntesis de proteínas, incorporando activamente aminoácidos en sus proteínas tanto en sistemas "in vivo" como "in vitro" (Sidney , 1971).

Klee y Sokoloff (1964), demostraron que los homogenizados de cerebro de rata (una vez eliminados núcleos y restos celulares), incorporaban leucina marcada en la fracción mitocondrial. También comprobaron como el crudo mitocondrial en determinadas condiciones mostraba capacidad para incorporar aminoácidos marcados (Klee y Sokoloff, 1965), no obstante esta fracción estaba contaminada con mielina y terminaciones nerviosas, pudiendo contener algún fragmento microsomal. Posteriormente investigaciones realizadas en otros laboratorios revelaron que preparaciones de mitocondrias de cerebro altamente purificadas eran activas en la incorporación de aminoácidos en sus propias proteínas (Bachelard, 1966; Campbell y col., 1966). Mokrasch (1966), aportó datos que sugerían que la mitocondria de cerebro de rata era más activa que otras fracciones celulares en la incorporación de leucina marcada en lipidoproteínas. El marcado de proteinolípidos aparece fundamentalmente localizado en el interior de la molécula (Mokrasch, 1966; Klee y Sokoloff, 1965). El cloranfenicol inhibió esta incorporación, interpretándolo Mokrasch, como una prueba inequívoca de la evidencia de síntesis proteica mitocondrial.

2.5.2.- Condiciones de incubación "in vitro".

Desde los primeros trabajos desarrollados por Mc Lean (1958) que comentó que la mitocondria aislada era capaz de incorporar aminoácidos "in vitro", gran esfuerzo se ha realizado para determinar los factores y composición adecuada de los medios de incubación para los estudios de biosíntesis proteica "in vitro". A pesar de que cada autor propone unas condiciones particulares, existen ciertos factores que se aplican de forma general.

En cuanto a la composición iónica del medio de incubación está comprobada la necesidad de potasio, oscilando su concentración desde 30 a 120 mM, la sustitución por sodio ó por amonio produce una disminución de la incorporación (Beattie e Ibrahim, 1973; Beatti, 1979). Hay autores que consideran necesaria la adición de $MgCl_2$ al medio, (Beattie, 1979), mientras que otros consideran suficiente la concentración existente en la mitocondria (Ramirez y col., 1972), no obstante se recomienda su presencia. El fosfato y el EDTA, han mostrado un efecto beneficioso en general (Gadaleta y col., 1976). En cuanto a los tampones empleados, en mitocondria de hígado se ha comprobado que el tampón bricina o tricina supone una mejora en la incorporación frente a Tris (Beattie, 1979), no obstante este efecto no se ha descrito para mitocondria de cerebro. El pH óptimo es $7,4 \pm 0,2$ (Ramirez y col., 1972). La adición de una mezcla de 19 aminoácidos al medio no supone aumento en los niveles de incorporación (Ramirez y col., 1972). En cuanto a las necesidades energéticas para soportar la síntesis proteica, no se ha encontrado modificación por la adición de sistemas exógenos productores de

energía, demostrándose que la mitocondria de cerebro posee suficiente ATP para mantener la síntesis proteica (Ramirez y col., 1972; Bachelard, 1966).

La temperatura óptima descrita por Giufrida y Gadeleta (1978), Ramirez y col. (1972), ha sido de 37° C. La concentración de proteína mitocondrial oscila de 1 a 3 mg/ml, siendo aconsejable una buena aireación y agitación a lo largo de la incubación.

Otro aspecto que debe ser perfectamente controlado y salvado es la eliminación de contaminación bacteriana tanto durante la preparación de las fracciones mitocondriales, como en el transcurso de la incubación, para ello se deben esterilizar todas las soluciones que se empleen a lo largo del proceso (Beattie, 1979).

2.5.3.- Características de la síntesis proteica de mitocondrias de cerebro

Debido a la dificultad encontrada para aislar fracciones de mitocondrias de cerebro con un buen estado de pureza, Gordon y Deanin (1968) apuntaron que la mitocondria de cerebro se comportaba cualitativamente distinta de las de otros órganos en la biosíntesis proteica, ya que ésta era inhibida totalmente por la cicloheximida y resistente a cloranfenicol. Posteriormente Morgan (1970), demostró que la mitocondria de cerebro se comportaba frente a cloranfenicol como las de otros órganos, debiéndose los resultados obtenidos por Gordon y Deanin a la presencia de contaminantes en sus preparaciones.

La incorporación es resistente a RNAasa, cicloheximida. No requiere la adición de la fracción de enzimas obtenidos a pH 5, ni el aporte de sistemas externos de energía. Presenta sensibilidad a cloranfenicol y puromicina y agentes desacoplantes (Campbell y col., 1966; Bachelard, 1966; Morgan y Austin, 1968; Ramirez, 1972).

La incorporación de aminoácidos ha sido estimulada por ADP, GTP, y determinados sustratos del ciclo cítrico, especialmente con α -cetoglutarato (Morgan y Austin, 1968).

Otro aspecto destacable es la dependencia de síntesis proteica en mitocondria de cerebro de su estado, siendo un importante factor el procedimiento empleado para su obtención (Campbell y col., 1966), así Hernández y col., (1978), Henn y col., (1976) comprobaron como las fracciones mitocondriales sometidas a altas fuerzas de centrifugación tenían disminuida su capacidad para incorporar aminoácidos.

En los estudios de vida media de la mitocondria de cerebro se ha comprobado que no se comportan con una unidad, sino que las proteínas solubles presentan una vida media inferior a la de la mitocondria completa, (Beattie y col., 1967 a). A su vez el valor del recambio de la proteína mitocondrial de cerebro ha resultado ser muy superior al de otros órganos (Beattie, 1967 a). Aunque hay que tener en cuenta que el valor de la vida media aportado por distintos grupos varía notablemente, desde 20 días aportados por Von Hungen y col. (1968), a los 26,3 de Beattie (1967) y a los 41 aportados por Rodríguez de Lores y col. (1971), dependiendo de la vía de administración del isótopo.

Hay que destacar el efecto de determinados agentes neuroquímicos sobre la biosíntesis proteica, así la clorpromazina y la serotonina (Campbell y col., 1966), causaron una inhibición en la incorporación "in vitro" mientras que el GABA en presencia de ADP, la acetil colina, DOPA, epinefrina y norepinefrina han provocado una estimulación (Sidney, 1971). A su vez Roth-Schechter y col. (1979) han comprobado un estímulo en el metabolismo general de la mitocondria de célula glial cultivada por efecto del pentotal.

De las dos fracciones mitocondriales existentes en la neurona, las dos han mostrado capacidad para la síntesis proteica mitocondrial "in vitro" (Morgan y Austin, 1968; Austin y Morgan, 1967; Ramirez y col., 1972; Larry y col., 1975). Aunque se ha querido implicar a cada fracción mitocondrial en la síntesis de proteínas específicas en función de su distinta localización, no se han encontrado datos experimentales que lo apoyen (Barondes, 1974).

2.5.4.- Síntesis proteica mitocondrial durante el desarrollo

La población mitocondrial en cerebro aumenta durante la fase activa del crecimiento, con un gran aumento en la proteína mitocondrial como comprobó Samson y col. (1960). También ciertos enzimas localizados en este orgánulo aumentaron su actividad durante el desarrollo (Flexner, 1955; Kuhlman y Lowry 1956; Giufreda y Gadaleta, 1973).

Una fracción de crudo mitocondrial de rata reveló la máxima incorporación de leucina a los 10 días de vida (Klee y Sokoloff, 1965). Este pico coincide con el periodo de mielinización

zación más activo y se relacionó con la síntesis de proteolípidos, del 10 al 20 día, la radioactividad específica de proteolípidos bajó a la décima parte de los valores máximos (Klee y Sokoloff, 1965). La mitocondria en el cerebro inmaduro aporta energía y otros factores requeridos para la síntesis proteica tanto mitocondrial, como microsomal más efectivamente que en el cerebro maduro (Klee y Sokoloff, 1964).

Mitocondrias purificadas de las regiones correspondientes a hemisferios cerebrales, tallo cerebral y cerebelo de ratas de 10 días de vida, han mostrado una actividad biosintética muy superior a la obtenida en ratas de 30 días, confirmándose la existencia de una gran actividad metabólica en esta etapa del desarrollo que coincide con los procesos de proliferación y diferenciación de las regiones cerebrales (Guifrida y Gadaleta, 1973).

118

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- MATERIAL

3.1.1.- Animales utilizados

En todos los experimentos se han utilizado ratas de la raza Wistar, con una edad de 2 - 3 meses y un peso aproximado de 200 - 250 g., suministradas por los criaderos de nuestra Facultad, usándose machos en los experimentos desarrollados en Ficoll, y hembras en el resto de las preparaciones.

Los animales se han matado por decapitación, el cráneo se abre rápidamente y se realiza un corte transversal en el cerebro al nivel de los tubérculos cuadrigéminos, utilizándose en los experimentos el denominado "forebrain" (cerebro anterior), que comprende el diencéfalo y telencéfalo sin bulbos olfatorios.

3.2.- PRODUCTOS Y APARATOS

3.2.1.- Productos

- Dextrano T 500, Ficoll 400 y Sephadex G-25 ("coarse") de Pharmacia Fine Chemicals.
- Triton X-100, PPO, POPOP de Packard.
- Filtros GF/C de Whatman.
- El resto de los productos han sido suministrados por SIGMA Chemical Company y MERCK.

3.2.2.- Isótopos

Los isótopos procedían de "The Radiochemical Centre" (Amersham), habiéndose empleado L- [4,5-³H] leucina de 40 - 60 Ci/mmol ó de 135 Ci/mmol y L- [U-¹⁴C] leucina de una actividad específica mayor de 300 mCi/mmol.

3.2.3.- Aparatos utilizados

- La homogenización se ha efectuado en homogenizadores de vidrio "Dounce homogenizer" (Bleassing Glass, Rochester, New York 14009) ó en potter Elvehjen y pistilo de teflón.
- Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga refrigerada "MSE High Speed 13", ó "Sorval RC-5 Superspeed refrigerated centrifuge" y las ultracentrifugaciones en una ultracentrifuga "Beckman L5-50 ultracentrifuge".

fugaciones en los modelos Beckman L5-50 con rotores SW 27.1 y Ti 50.1 ó "MSE 50 centrifuge" con los rotores SW 3 x 23 ml. y 6 x 38 ml.

- Los ajustes de pH se hicieron en un pHmetro 22 Radiometer.
- Las pesadas se realizaron en balanza eléctrica de precisión "Mettler".
- Las actividades enzimáticas y espectros de citocromos, se leyeron en los espectrofotómetros Unicam SP 1800, SP 1750 y SP 800, con registrador automático.
- El control respiratorio se logró mediante registro polarográfico con el microelectrodo Clark type (Yellow Springs Instruments Company, Yellow Springs, Ohio).
- Las medidas de radioactividad se consiguieron en un contador de centelleo líquido "Packard, mod. Tri-Carb, 2425".
- Los índices de refracción se midieron en un refractómetro de Abbe, PZO Warszawa RL-Nr.
- La esterilización del material de vidrio se consiguió en una estufa Electro Helios de 240° C de temperatura.
- Los agitadores mecánicos eran de la marca "Cenco" y "Gricel".

- Las filtraciones sobre filtros Whatman se realizaron en un aparato de filtración Millipore.
- Las incubaciones se han efectuado en un baño con agitación "Selecta, Unitronic-320".

3.3.- METODO

3.3.1.- Esterilización del material

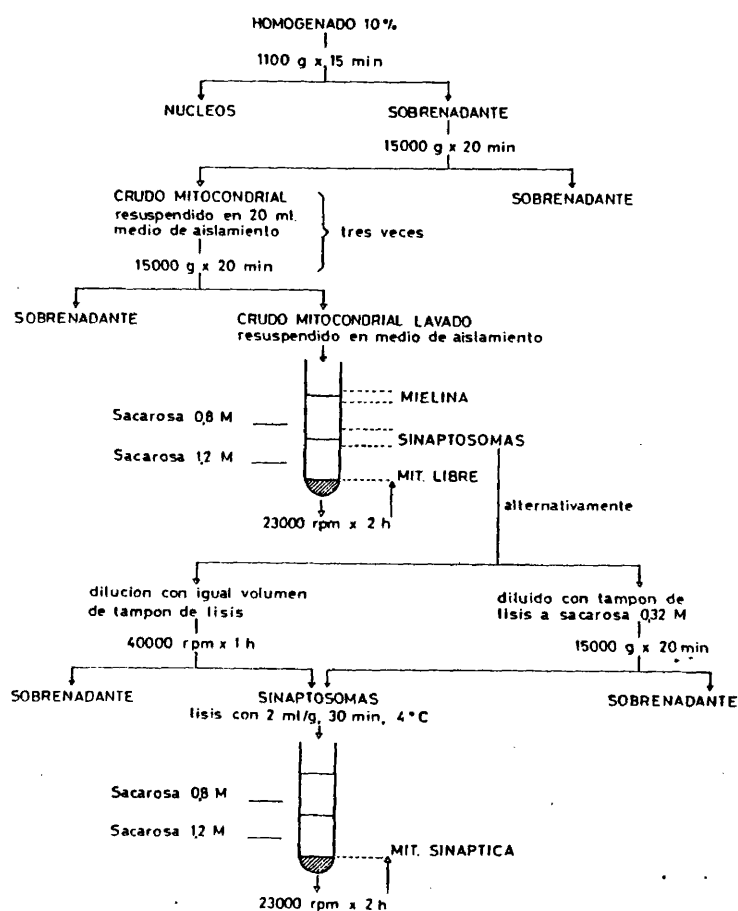
En los experimentos donde se han llevado a cabo incorporaciones "in vitro", el material de vidrio (Pirex) se esterilizó por calor seco en estufa durante 3 horas a 180° C. Los medios de aislamiento y solución de Ficoll se esterilizaron en autoclave a vapor fluente, por espacio de 5 minutos. La esterilización del medio de incubación así como de sustancias termolábiles se efectuó por filtración, en filtros Millipore GS de 0,22 μ m.

3.3.2.- Métodos de aislamiento

3.3.2.1.- Aislamiento de mitocondrias por gradiente discontinuo de sacarosa

El método está basado en Gray & Whittaker (1962), con algunas modificaciones. Una vez sacrificada la rata por decapitación, se extrae el cerebro lo más rápidamente posible y se coloca en medio de aislamiento (Sacarosa 0,32 M, EDTA 1mM, Tris ClH 1mM pH 7,4), se trocean con tijeras y se añade más medio de aislamiento, se deja reposar y se decanta y se vuelve a lavar con medio de aislamiento eliminándose la mayoría de los glóbulos rojos de la preparación. Se realiza la homogenización en medio de aislamiento al 10 %, ayudándonos de un potter Elvehjem de vidrio y pistilo de teflón a 400 r.p.m. y 8 movimientos completos de subida y bajada. El homogenado se centrifuga a 1.100 g, durante 10 min. desechando el precipitado y recogiendo el so

brenadante, el cual se centrifuga a 15.000 g, durante 20 min. para recoger el precipitado que constituye el crudo mitocondrial. Este crudo se resuspende en 20 ml. de medio de aislamiento y se centrifuga a 15.000 g, durante 20 min., desechando el sobrenadante y recogiendo el precipitado. Esta operación se repite tres veces obteniéndose el precipitado del crudo mitocondrial lavado. Este crudo se resuspende en medio de aislamiento y se coloca en la superficie de un gradiente discontinuo de sacarosa constituido por dos bandas de 7 ml. de sacarosa 0,8 M y 1,2 M en EDTA 1 mM, Tris ClH 1 mM pH 7,4. Ese gradiente se desarrolla tras centrifugación en el rotor SW 27.1 a 22.000 r.p.m., dos horas a 4°C proporcionando tres fracciones bien diferenciadas: en la interfase del medio de aislamiento y la banda de sacarosa 0,8 M aparece la fracción de mielina; en la interfase de sacarosa 0,8 M y 1,2 M se encuentra la fracción de sinaptosomas y en el fondo del tubo aparece un precipitado de mitocondrias libres. Con la fracción de sinaptosomas se ha procedido de dos formas diferentes. En algunos casos se ha diluido una vez su volumen con EDTA 1 mM y tampón Tris ClH 1 mM a pH 7,4, y se ha centrifugado a 40.000 r.p.m. una hora en el rotor Ti 50.1, obteniéndose un precipitado de sinaptosomas, o bien se ha diluido con el mismo tampón hasta una concentración de sacarosa 0,32 M aproximadamente, y se ha centrifugado a 15.000 g, durante 20 min. obteniendo el precipitado de sinaptosomas. La lisis de los sinaptosomas se realizó por choque hipoosmótico con EDTA 1 mM, tampón Tris ClH 1 mM a pH 7,4 durante media hora a 4°C en baño de hielo, en la proporción de 2 ml/g de tejido inicial. El lisado se coloca sobre la superficie de un gradiente discontinuo de sacarosa constituido por dos bandas de 5 ml de sacarosa 0,8 M y 1,2 M en EDTA 1 mM y tampón Tris ClH 1 mM a pH 7,4, desarrollándolo por centrifuga



ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA.

ción a 23.000 r.p.m. durante dos horas en un rotor SW 27.1 y proporcionándonos en el fondo del tubo el precipitado de mitocondrias sinápticas. Los precipitados de mitocondrias libres y sinápticas se resuspenden en el medio de aislamiento obteniéndose una preparación adecuada para la realización de los distintos ensayos funcionales.

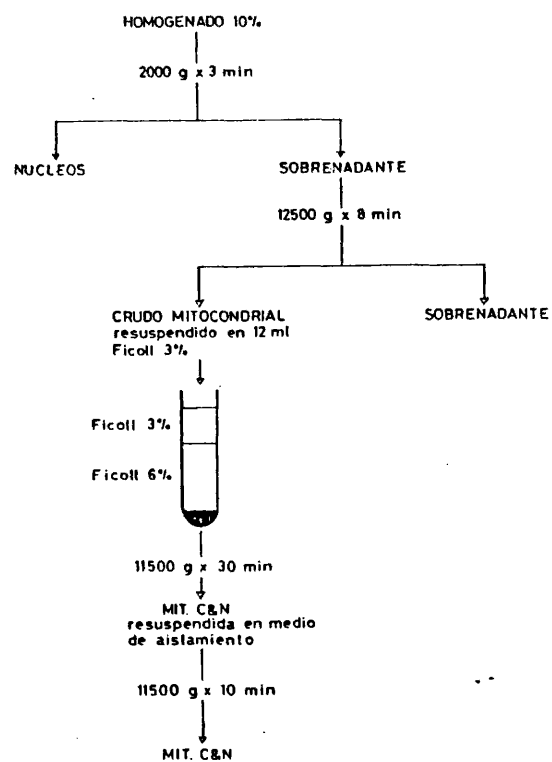
3.3.2.2.- Aislamiento de mitocondrias por gradiente de Ficoll

A) Preparación de Ficoll 20 % p/p

Todas las soluciones de Ficoll se han obtenido por dilución de una solución madre de Ficoll al 20 % p/p; ésta se preparó a partir de una solución de Ficoll en agua destilada al 30 % p/p, tras 5 horas de diálisis y posterior determinación de su peso específico por gravimetría, ajustando su concentración final al 20 % p/p.

B) Obtención de mitocondrias libres de origen no sináptico por el método de Clark y Nicklas

El procedimiento está basado en Clark and Nicklas (1970). Los cerebros procedentes de 3 ratas se trocean con tijeras y se lavan con medio de aislamiento (sacarosa 0,25 M, EDTA- K^+ 0,5 mM, Tris ClH 10 mM, pH 7,4), dos veces para eliminar los glóbulos rojos. Este material se homogeniza manualmente con 30 ml. de medio de aislamiento en un homogenizador de vidrio Dounce, con pistilo de vidrio y "clearance" de 0,05 mm, por 12 emboladas completas de subida y bajada. El homogenado resultante se diluye hasta 60 ml. con medio de aislamiento y se centrifuga a



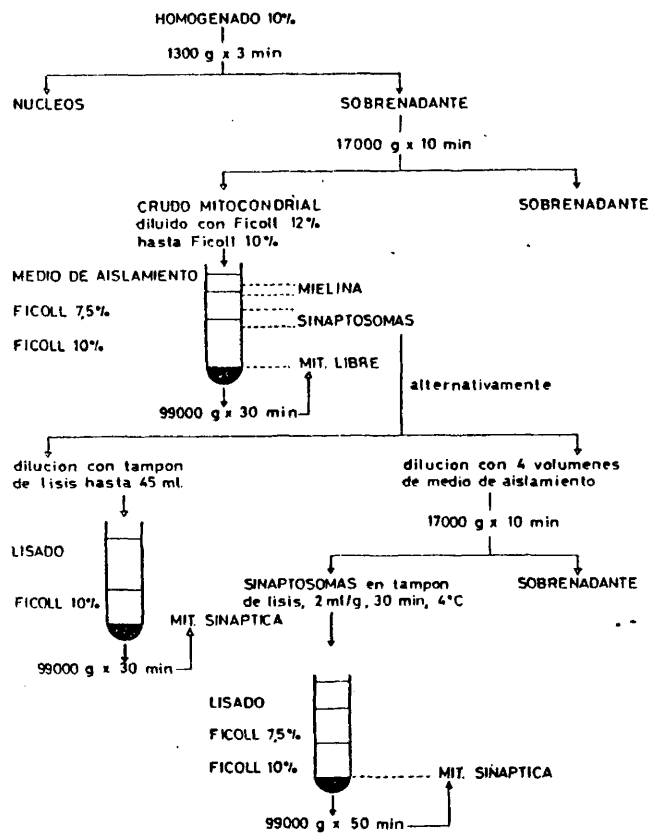
ESQUEMA DEL AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS "CLARK & NICKLAS"

2000 g, 3 min., recogiendo el sobrenadante y centrifugándolo a 2000 g, 3 min. El crudo mitocondrial se obtiene por centrifugación del último sobrenadante a 12.500 g, 3 min. y se resuspende en 12 ml. de medio de Ficoll a 3 % (obtenido del medio Ficoll 6 % por dilución con agua destilada y ajustando el pH a 7,4), 6ml de esta suspensión se colocan sobre 25 ml. de medio Ficoll 6 % (Ficoll 6 % p/p, manitol 0,24 M, sacarosa 60 mM, EDTA-K⁺ 50 μ M, Tris ClH 10 mM, pH 7,4) y se centrifuga a 11.500 g, 30 min. El sobrenadante juntamente con la capa blanquecina depositada sobre el precipitado se eliminan. El precipitado se lava dos veces con 5 ml. de medio de aislamiento y se decanta. Posteriormente se resuspende en 20 ml de medio de aislamiento y se centrifuga a 11.500 g, 10 min. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se vuelve a suspender en 1 ml del medio de aislamiento, utilizando esta preparación para los distintos ensayos metabólicos. Todas las operaciones se desarrollaron a 4° C.

C) Obtención de mitocondrias libres y sinépticas por gradientes discontinuos de Ficoll

Está basada en Lai y col. (1977), Booth y Clark (1978), con algunas modificaciones. En cada experimento se han utilizado 12 cerebros divididos en 3 lotes. El material de cada lote (4 cerebros) se troceó, se lavó dos veces con medio de aislamiento (sacarosa 0,32 M, EDTA-K⁺ 1 mM, Tris ClH 10 mM, pH 7,4) para eliminar los glóbulos rojos y se homogenizó manualmente con 30 ml. de medio de aislamiento en un homogenizador Dounce con pistilo de vidrio ("clearance" total 0,1 mm) por 12 emboladas completas. El homogenado se diluyó a 60 ml con medio de aislamiento. Esta homogenización se realizó con cada lote por separa

do y posteriormente se unieron todos los homogenados, los cuales se centrifugaron a 1.300 g, 3 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 17.000 g, 10 min. obteniéndose el crudo mitocondrial. Este precipitado se resuspende en 15 ml de medio de aislamiento, diluyéndose a continuación con 90 ml de Ficoll al 12 % (Ficoll 12 % p/p, sacarosa 0,32 M, EDTA-K⁺ 50 μ M, Tris ClH 10 mM, pH 7,4), homogenizándose suavemente con un potter de vidrio y pistilo de teflón de 0,375 mm de "clearance" para obtener una buena suspensión. Posteriormente se formaron gradientes discontinuos de Ficoll con 18 ml de la suspensión anterior, 10 ml de Ficoll 7,5 % (Ficoll 7,5 % p/p, sacarosa 0,32 M, EDTA-K⁺ 50 μ M, Tris ClH 10 mM, pH 7,4) y 5 ml de medio de aislamiento, centrifugándose a 25.000 r.p.m. durante 60 min., obteniéndose la mielina en la interfase del medio de aislamiento con el Ficoll 7,5 %; la fracción de sinaptosomas en la interfase de Ficoll 7,5 % y Ficoll 10 % y un precipitado en el fondo del tubo de mitocondrias libres. La fracción de sinaptosomas se recogió con la ayuda de una pipeta Pasteur y se diluyó hasta 45 ml con tampón Tris ClH 6 mM pH 8,1, homogenizando la suspensión en el homogenizador Dounce y pistilo de vidrio con un "clearance" total de 0,05 mm con 8 emboladas completas; 15 ml del lisado resultante se colocan sobre 5 ml de Ficoll 10 % (obtenido del Ficoll al 12 % por dilución con agua destilada) y se centrifuga a 30.000 r.p.m. 30 min. recogiendo un precipitado en el fondo del tubo constituido por mitocondrias sinápticas. Los precipitados de mitocondrias libres y sinápticas se lavan con 5 ml de medio de aislamiento dos veces para eliminar la ligera capa blanquecina que aparece alrededor de los precipitados. Posteriormente los precipitados de ambas fracciones mitocondriales se resuspenden por separado en 20 ml de medio BSA (19 ml de medio de aislamiento



ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTES DISCONTINUOS DE FICOLL.

to y 1 ml de BSA 10 mg/ml) y se centrifugan a 2000 g, 10 min., los sedimentos resultantes se resuspenden en medio de aislamiento, utilizando estas suspensiones para los distintos ensayos metabólicos.

Cuando no se disponía de los rotores SW 6 x 38ml y 3 x 25 ml de la ultracentrifuga MSE-50, se utilizó como material de partida 8 ratas y se modificaron los gradientes para obtener mitocondrias libres formando 6 gradientes de 9 ml. de la suspensión del crudo mitocondrial, 5 ml de Ficoll 7,5 % y 2 ml de medio de aislamiento centrifugando a 25.500 r.p.m., 30 min. en el rotor SW-27.1 de la centrifuga Beckman L5-50. Con la fracción de sinaptosomas se procedió de la siguiente manera: una vez recogida se diluyó con 4 volúmenes de medio de aislamiento y se centrifugó a 17.000 g, 10 min., el precipitado se lisó con tampón Tris ClH pH 8,1, 2,5 ml/gramo de tejido, dejándolo en reposo 30 minutos a 4° C. Finalizada la lisis se formaron 4 gradientes discontinuos de Ficoll constituidos por 5 ml de Ficoll 10 % , 5 ml de Ficoll 7,5 % y 7 ml de lisado, centrifugándose a 25.500 r.p.m durante 50 min. en el rotor SW 27.1. Con los precipitados de mitocondrias libres y sinápticas se procedió como se describió enteriormente. Todas las operaciones fueron realizadas a 4° C.

3.3.2.3.- Aislamiento de mitocondrias libres y sinaptosomas por partición en sistemas bifásicos

a) Obtención de mitocondrias brutas

Se han utilizado 10 ratas por experimento. Los cerebros se trocearon con tijeras y se lavaron con medio de aislamiento (sacarosa 0,32 M, EDTA-K⁺ 1 mM, Tris ClH 1 mM, pH 7,4)

dos veces, para eliminar la mayoría de los glóbulos rojos de la preparación. La homogenización se ha realizado al 15 % p/v en el medio de aislamiento con un potter de vidrio Elvehjen y pistilo de teflón a 200 r.p.m. con 5 movimientos completos de subida y bajada. El homogenado se centrifuga a 1100 g, 10 min., desechando el precipitado y centrifugando el sobrenadante a 12000 g, 20 min. El sobrenadante se decanta y se recoge el precipitado que constituye el crudo mitocondrial. Este precipitado se resuspende en 12 ml de medio de aislamiento; 6 ml se depositan sobre una banda de 20 ml de Ficoll al 6 % (Ficoll 6 % p/p en medio de aislamiento) y se centrifuga a 12000 g, durante media hora, decantando con cuidado el sobrenadante. El sedimento está formado por dos partes bien diferenciadas: un botón marrón y una capa blanca voluminosa, constituido por mitocondrias libres y sinaptosomas respectivamente. Los sinaptosomas se recogen invirtiendo el tubo de centrifuga, mientras que el botón de mitocondrias permanece fijo en el fondo del tubo. Los sinaptosomas se diluyen con 3 volúmenes de medio manitol (manitol 0,32 M, EDTA 0,1 mM, tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7,8) y se centrifuga a 10.000 g, 10 min., tanto este precipitado de sinaptosomas como el de mitocondrias brutas se resuspenden en 1 ml de medio manitol.

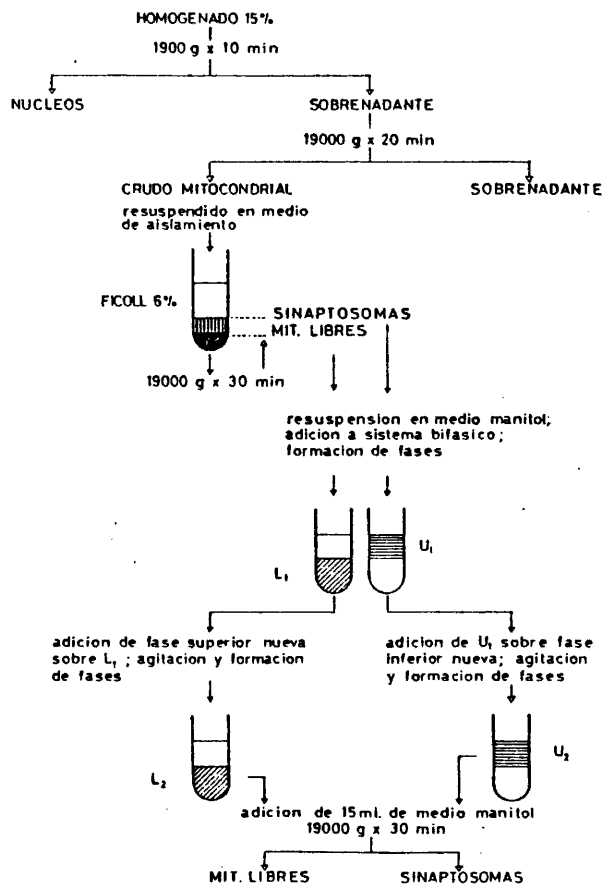
b) Preparación del sistema bifásico

El sistema bifásico se preparó a partir de soluciones madres de polímeros y de sales formando 20 gramos de un sistema con la siguiente composición: 6,4 % (p/p) Dextrano T500, 6,4 % (p/p) polietilenglicol 4000, EDTA 0,1 mM, 0,1 % BSA (libre de ácidos grasos), sorbitol 0,32 M, Tampón fosfato potásico

5 mM, pH 7,8, y dejándose durante una noche a 4° C, disponiendo al día siguiente de las fases perfectamente separadas.

Un gramo de los resuspendidos de mitocondrias brutas y de sinaptosomas se añadieron a dos tubos conteniendo cada uno de ellos 7 gramos de una solución cuya composición después de la adición del material fué la misma del sistema bifásico anteriormente citado. Dicho sistema se agitó 20 veces por inversión del tubo, centrifugándose a continuación a 3000 r.p.m. durante dos min., transcurrido este tiempo se formaron dos fases la superior y la inferior. La fase superior (U_1 del esquema adjunto) fué cuidadosamente recogida con una pipeta Pasteur, y se añadió a un tubo que contenía 3 ml. de la fase inferior (obtenido del sistema bifásico anteriormente formado). A la fase inferior é interfase (L_1 del esquema adjunto) se añadió 3 ml. de la fase superior. Los dos sistemas así obtenidos se trataron como se ha descrito anteriormente. Las fases superior e inferior (U_2 y L_2 , del esquema adjunto) se diluyeron con 15 ml de medio manitol y se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 min. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 30 ml. de medio manitol y se recentrifugaron en las mismas condiciones. Los sedimentos resuspendidos en medio de aislamiento nos proporcionaron las fracciones de mitocondrias libres y sinaptosomas para estudios posteriores.

Cuando se han realizado ensayos respiratorios la última centrifugación se realizó en medio ESA formado por 19 ml de medio de aislamiento y 1 ml de BSA 10 mg/ml.



ESQUEMA DE AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS POR BIFASE.

3.3.2.4.- Purificación de mitocondrias libres y sinópticas de Ficoll por partición en sistemas bifásicos

Los precipitados de mitocondrias libres y sinápticas obtenidas por gradientes discontinuos de Ficoll al 7,5 % y 10 % se resuspendieron en 1 ml de medio manitol, 0,5 ml de esta suspensión se depositó sobre una bifase de 3,5 g, cuyas concentraciones finales fueron 6,5%p/p Dextrano T 500, 6,5 % p/p Polietilenglicol 4000, sorbitol 0,32 M, EDTA 0,1 mM, tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7,8, procediendo como se ha descrito en la sección anterior.

3.3.3.- Determinación de actividades enzimáticas

3.3.3.1.- Actividad citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1)

La actividad citocromo c oxidasa fué determinada espectrofotométricamente por la velocidad de oxidación del citocromo c reducido a 550 nm. La mezcla de reacción contenía 1 ml. de citocromo c reducido (25 μ M) en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,0 y 20 μ l de cada fracción que corresponden a 4 μ g de proteína (Turner, 1973).

La preparación de citocromo c reducido se logró a partir del compuesto oxidado en tampón fosfato, por adición de una punta de espátula de ditionito sódico y eliminación posterior del mismo por paso a través de una columna de sephadex G-25 ("coarse"). La fracción con el citocromo c reducido se ajustó a una densidad óptica de 0,7 y las lecturas se realizaron a 25° C.

3.3.3.2.- Actividad de la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27)

Se llevó a cabo según Clark & Nicklas (1970), siguiendo espectrofotométricamente la oxidación del NADH a 340 nm en un medio que contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,4, Piruvato 1 mM, NADH 0,2 mM, y 0,5 % Triton X-100 producida por cada fracción.

3.3.3.3.- Actividad acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7)

Se ha determinado por el método de Ellman y col. (1961), basado en la hidrólisis del Ioduro de acetil de tiocolina y aumento de la absorción óptica a 412 nm por la reacción de la tiocolina con el reactivo de Ellman, para ello se preparó un medio que contenía Ioduro de tiocolina 0,75 mM, reactivo de Ellman 0,2 mM, tampón fosfato potásico 100 mM pH 8 para cada determinación.

3.3.3.4.- Actividad citrato sintasa (EC 4.1.3.7)

Se ha realizado según Clark y Land (1974), midiendo la producción de Coenzima A libre a partir de Acetil Coenzima A y aumento de la absorción a 412 nm por la reacción del CoA libre con el reactivo de Ellman. Para cada determinación se preparaba una solución con 65 nmol de Acetil CoA, 130 nmol de oxalacetato potásico, 130 nmol de reactivo de Ellman, 130 μ mol de Tris ClH pH 8 con 0,03 % Triton X-100 en un volumen final de 1,3 ml usando aproximadamente 20 μ g de proteína por ensayo.

3.3.3.5.- Actividad NADPH citocromo c oxidorreductasa (EC 1.6.2.4)

Está basada en Cartledge y Lloyd (1972), siguiendo espectrofotométricamente la reducción de citocromo c oxidado a 550 nm. La mezcla de reacción contiene tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,5, cianuro potásico 3 mM, citocromo c oxidado 0,03 mM, NADPH 0,2 mM.

3.3.3.6.- Actividad fumarasa (EC 4.2.1.2)

La actividad fumarasa está basada en el método de Raker (1950), determinando el aumento de absorción óptica a 240 nm, debido a la formación de fumarato en un medio que contenía malato sódico 50 mM en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7,5.

3.3.3.7.- Actividad succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1)

Se ha efectuado por el método de Green y col. (1955), basado en la oxidación del succinato y disminución de la absorción óptica a 600 nm por la reducción del 2,6 diclorofenol indofenol.

Para ello se preparó un medio que contenía EDTA 3 mM, KCN 3 mM, DCIP (2,6 diclorofenol indofenol) 0,1 mM, tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,6 y succinato sódico 9 mM.

3.3.3.3.- Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores (1951), o por el método de biuret, se

gún Gornall y col. (1949), con standard de albúmina de suero bovino.

3.3.4.- Actividad respiratoria

El consumo de oxígeno se ha medido polarográficamente con un microelectrodo del tipo Clark. El medio utilizado contenía 5 ó 100 mM potasio. El medio 5 mM potasio está constituido por: Manitol 225 mM, Sacarosa 75 mM, EDTA-K⁺ 0,005 mM, KCl 5 mM, Fosfato tris 5 mM pH 7,4 y Tris ClH 10 mM pH 7,4. El medio potasio 100 mM contenía: Manitol 75 mM, Sacarosa 25 mM , EDTA-K⁺ 0,005 mM, KCl 100mM, Fosfato tris 5 mM pH 7,4 y Tris ClH 10 mM pH 7,4.

Para cada determinación se utilizaba aproximadamente 1 mg de proteína y la temperatura de 25° C.

El estado III se inició por la adición de ADP 0,5 mM en presencia de los sustratos. La razón de control respiratorio (RCR) se ha determinado por el cociente entre el estado III y IV, según Chance y Williams (1956).

3.3.5.- Espectro de citocromos a 25° C

El espectro de los citocromos reducidos con ditionito menos oxidado se han realizado en un espectrofotómetro Unicam SP 1300 a 25° C, en cubetas de cuarzo de 1 ml con una ventana de 1 mm y velocidad de la carta de 10 nm/cm.

3.3.6.- Determinación de ácidos nucleicos

3.3.6.1.- Extracción de ácidos nucleicos

El método está basado en el desarrollo por Schneider (1957). Los sedimentos de mitocondrias se resuspendieron en el medio de aislamiento y se incubaron una hora a 4° C con RNAasa del tipo A y B 50 μ g/ml, DNAasa del tipo I y II 25 μ g/ml para eliminar el RNA y DNA no mitocondrial que pudiese tener la preparación mitocondrial. Una vez incubado, se centrifugó a 17.000 g, 10 min. a 4° C, eliminando el sobrenadante y recogiendo el sedimento. El sedimento de mitocondrias libres se suspende en 4 ml y el de mitocondrias sinópticas en 1 ml de medio de aislamiento. Un mililitro de cada fracción mitocondrial se trata con 2,5 ml de TCA 10 % centrifugando posteriormente a 3000 r.p.m., 10 min. a 4° C eliminando el sobrenadante. El precipitado se trata con 2,5 ml de TCA al 10 % y se centrifuga a 3000 r.p.m., 10 min a 4° C recogiendo el sedimento, el cual es resuspendido en 1,3 ml de agua y se trata con 1,3 ml de TCA 10 % calentando la muestra 15 minutos a 90° C. Posteriormente la solución se centrifuga a 3000 r.p.m. 10 min. a 4° C recogiendo el sobrenadante. El sedimento se trata con 2,5 ml de TCA al 5 % y se centrifuga a 3000 r.p.m., 10 min. recogiendo el sobrenadante que juntamente con el procedente de la centrifugación anterior contendrá los ácidos nucleicos de nuestro material.

3.3.6.2.- Estimación cuantitativa de RNA y DNA

La valoración cuantitativa se ha realizado por aplicación de las técnicas colorimétricas de Dische (1955) y

Burton (1956), con utilización de ácidos nucleicos puros para la preparación de soluciones standard.

3.3.7.- Incorporación de ^3H Leucina en cortes de cerebro

3.3.7.1.- Preparación de cortes

Los cortes de cerebro se preparan con la ayuda de un cortador de geles, para ello, una vez obtenido el cerebro se dividió cada hemisferio en dos por un corte longitudinal y posteriormente se aplicaba el cortador de geles. Los cortes producidos tenían una sección máxima de 0,3 mm y el tiempo desde el sacrificio del animal hasta la preincubación no excedió de 3 - 4 minutos, siendo estas dos características de gran importancia para el mantenimiento de las propiedades biológicas de los cortes, según Mc Ilwain y col. (1961) y Bacheland y col. (1962). En algunos experimentos se sustituyó el cortador de geles por un émbolo, pasando el cerebro a través de una malla de nylon que nos proporcionó el material adecuado para la incubación.

3.3.7.2.- Incubación de los cortes

Está basada en White y col. (1972) y Larry y col. (1975). Los cortes obtenidos de un cerebro, aproximadamente 1 g de material, se colocaron en un matraz erlenmeyer de 25 ml y se adicionó 10 ml de medio Krebs-Ringer fosfato de Mc Ilwain, Mc Ilwain (1951), Keesey col. (1965) y posteriormente modificado por Larry y col. (1975) en orden a mantener un pH de 7,2 a lo largo de toda la incubación, constituido por NaCl 50 mM, KCl 5,1 mM, CaCl_2 0,75 mM, MgSO_4 1,3 mM, Glucosa 10 mM, Tampón fosfato

sódico 50 mM, ajustando el pH final a 7,2. La incubación se desarrolló en un baño de agua con agitación a la temperatura de 37° C y con borboteo continuo de gas de oxígeno puro. Los cortes se preincubaron durante 15 minutos; a partir de este momento se adicionó 20 μ Ci de ^3H Leucina 40 - 60 Ci/mmol manteniendo las condiciones mencionadas durante 1 hora. La incorporación se paró sacando los matraces del baño y adicionando 5 ml de medio de aislamiento, con leucina fría, Sacarosa 0,32 mM, EDTA 1 mM, Tris ClH 1 mM pH 7,4, L Leucina 10 mM y centrifugando a 5000 r.p.m. a 4° C durante un minuto. El sedimento se resuspende en 20 ml de medio de aislamiento con leucina fría y se centrifuga 1 minuto a 5000 r.p.m. a 4° C. Con este precipitado se procedió a la extracción descrita en la sección 3.3.2.1 para obtener las fracciones mitocondriales.

En los experimentos realizados con antibióticos, se adicionaron al medio en las concentraciones señaladas al pie de tablas y figuras, antes de la adición de la leucina tritiada.

3.3.7.3.- Medida de la radioactividad

Para determinar la incorporación de aminoácidos en proteína, la fracción de mitocondria libre y sináptica se resuspende en medio de aislamiento en una concentración aproximada de 2 mg/ml. Por duplicado se toman muestras de 0,5 ml a las que se adiciona 0,5 ml de TCA 20 % p/v y se dejan 1 hora en reposo a 4° C. El precipitado se recoge en filtros G/F Whatman y se lava dos veces con 5 ml de TCA al 5 %. Una vez secados los filtros se añade 5 ml de líquido de centelleo (PPO 5 g, POPOP 0,1 g, en tolueno 1000 ml y Triton X-100 en proporción 2:1). Las

muestras se leyeron en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb mod 2425.

3.3.8.- Experimentos "in vivo"

3.3.3.1.- Técnica para la inyección intracerebroventricular en la rata sin anestesia

El método está basado en Chermat & Simon (1975), con algunas modificaciones. Se inmovilizó al animal con la mano izquierda asiéndole con los dedos pulgar e índice en la zona del cuello y estirando la piel. Una vez en esta posición y con la zona ventral de la cabeza apoyada sobre la mesa se procedió a tomar las referencias con una plantilla triangular de plástico transparente, haciendo coincidir la base con el borde posterior de los ojos y el vértice con la línea media de la cabeza. La cánula soportada solidariamente en la plantilla, fue así guiada a una zona situada aproximadamente a 2,5 mm detrás de la sutura coronaria y a 2,5 mm a la derecha de la sutura sagital. La cánula se introdujo a presión de forma que atravesara el hueso del cráneo y penetrara 3 mm desde la base de la plantilla, a continuación, se hizo pasar a su través una jeringa Hamilton (volumen 10 μ l) descendiendo hasta 5 mm (medido desde la base de la plantilla). Esta profundidad resultó ser adecuada al peso de los animales utilizados. Se verificó periódicamente con colorante el lugar de la inyección, resultando ser precisa su ejecución mediante este método. En cada experimento se ha administrado 20 μ Ci de leucina tritiada, en 20 μ l.

3.3.8.2.- Aislamiento de fracciones mitocondriales

Una vez sacrificadas las ratas se ha realizado un fraccionamiento subcelular para obtener las fracciones de mitocondrias libres y sinápticas a través de un gradiente discontinuo de sacarosa como se ha descrito anteriormente.

3.3.8.3.- Medida de la radioactividad

La radioactividad se ha medido como se describe en el apartado anterior.

3.3.9.- Experimentos "in vitro"

3.3.9.1.- Incorporación de ^3H Leucina en mitocondrias obtenidas por Ficoll

Las mitocondrias obtenidas por Ficoll se han suspendido en el medio de aislamiento y con esta suspensión se han realizado los experimentos de incorporación.

Como medio de incubación se ha utilizado el medio de respiración 100 mM K^+ . La concentración de isótopo ha sido $1\mu\text{Ci/ml}$ de medio/mg de proteína mitocondrial aproximadamente. Como fuente de energía se ha usado los siguientes tipos:

- Sistema externo generador de ATP: ATP 2 mM, fosfoenol piruvato 5 mM, $50\mu\text{g/ml}$ piruvato quinasa.
- Sistema endógeno: Se adiciona al medio sustratos oxidables como succinato 10 mM o glutamato 10 mM, y piruvato en presencia de malato 2,5 mM.

En el primer sistema, el ATP se genera en el medio y posteriormente pasará a la mitocondria, mientras que en el segundo sistema el ATP lo produce la mitocondria por fosforilación oxidativa, Beattie e Ibrahim (1973).

El estado III se ha mantenido durante la incubación por exceso de ADP, ADP 20 mM o por medio de un "trap" de hexoquinasa, formado por glucosa 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ADP 1 mM, dializado de hexoquinasa 0,1 U por mg de proteína mitocondrial.

Otro sistema utilizado ha sido glutamato 25 mM y Atractilósido 50 μ M, Mockel y Beattie (1975).

Las incubaciones se han realizado en matraces erlenmeyer de 25 ml. estériles, en un baño con agitación continua a 37° C tomándose a cada tiempo una muestra de 0,5 ml por duplicado y adicionandolo sobre 0,5 ml de TCA al 20 % p/v.

3.3.9.2.- Incorporación de ^{14}C Leucina en mitocondrias obtenidas por Ficoll

La pauta seguida ha sido la misma que con la leucina tritiada, modificando el medio de incubación, al que se añadió $MgCl_2$ 6 mM.

Las incubaciones se realizaron en tubos de vidrio esterilizados de 10 ml, tomándose muestras de 0,3 ml por duplicado y adicionándolas sobre 0,3 ml de TCA 20 %.

3.3.9.3.- Determinación de radioactividad

La radioactividad se determinó como se ha descri

to anteriormente.

3.3.9.4.- Control de contaminación bacteriana

El control de contaminación se ha realizado al final de la incubación sembrando las muestras diluidas en placas de agar-sangre o de Tryptic Soy agar (DIFCO) y cultivandolas durante 24 horas a 37° C.

3.3.10.- Microscopía electrónica

La técnica está basada en Larsson y col. (1971). Las suspensiones de las partículas se han fijado con glutaraldehído al 4 % adicionando a 0,4 ml de cada suspensión 15 μ l de glutaraldehído al 25 %. Después de varias horas de reposo se centrifugaron a 600 g, 10 min, lavando los sedimentos con medio manitol; posteriormente, éstos se fijaron con OsO_4 al 2 % en tampón fosfato sódico 0,1 M durante una hora, a continuación se deshidrataron con etanol y se embebieron en Epon. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB y se tñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

76

4.- RESULTADOS

4.1.- EXPERIENCIAS "IN VIVO"

4.1.1.- Caracterización de mitocondrias aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa

4.1.1.1.- Actividades enzimáticas

A lo largo del proceso de obtención de mitocondrias libres y sinápticas se han tomado alícuotas de cada fracción caracterizándolas por enzimas marcadores, utilizando la actividad lactato deshidrogenasa como marcados citoplásmico; la actividad acetil colinesterasa como marcador de membrana, y las actividades citocromo c oxidasa y citrato sintasa, como marcadores mitocondriales. En la Tabla I se describen las actividades enzimáticas totales por fracción. La actividad lactato deshidrogenasa se localiza mayoritariamente en el sobrenadante post mitocondrial representando el 45,25 % de la actividad total en presencia de Triton X-100; las fracciones mitocondriales representan el 0,41 % y el 0,071 % de la actividad total en mitocondrias libres y sinápticas respectivamente. A su vez por efecto del Triton X-100 hay un aumento de la actividad de dicho enzima en todas las fracciones siendo de 3,4 veces en la fracción de sinaptosomas. La actividad acetil colinesterasa en mitocondrias representa el 0,37 % y el 0,13 % de la actividad total en libres y sinápticas respectivamente. Las actividades de citrato sintasa en mitocondria libre y sináptica supone el 5,45 % y 1,5 % de las actividades totales y el 8,34 % y 2,3 % de la actividad total de citocromo c oxidasa respectivamente. El rendimiento en proteínas mitocondriales es el 0,7 % y el 0,21 % respecto de la proteína total del homogenado.

En la Tabla II se expresan las actividades enzimáticas específicas, apareciendo los valores más bajos en las fracciones mitocondriales para los enzimas marcadores de contaminantes, membrana y citoplasma, siendo las actividades enzimáticas específicas de citocromo c oxidasa y citrato sintasa las más elevadas en dichas fracciones.

TABLA I

ACTIVIDADES ENZIMATICAS TOTALES DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintasa	Cit. c oxidasa	Protei na
Homogenado	317,768	536,038	54,648	164,542	7,958	885,500
Nucleo	58,632	121,926	20,034	50,400	1,386	472,500
Crudo mitocondrial	33,528	118,302	17,340	67,938	8,244	125,250
Sobrenadante postmitocondrial	194,368	242,560	15,872	12,512	1,216	130,000
Sinaptosomas	20,318	69,480	8,776	45,259	1,245	116,550
Mitocondrias libres	1,585	2,217	0,208	8,982	0,704	6,500
Mitocondrias sinápticas	0,228	0,381	0,073	2,522	0,226	1,912

Las actividades están expresadas en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{volumen}$ de la fracción.

Para el estudio enzimático de este fraccionamiento se utilizaron cuatro ratas.

TABLA II

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintasa	Citocromo c oxidasa
Homogenado	358	605	61,0	185,0	8,98
Nucleo	124	258	42,4	106,0	2,90
Crudo mitocondrial	267	944	138,0	542,0	65,80
Sobrenadante postmitocon.	1495	1865	122,0	96,2	9,35
Sinaptosomas	174	596	75,3	388,0	10,60
Mitocondrias libres	243	340	32,0	1381,0	108,00
Mitocondrias sinápticas	119	201	38,0	1319,0	118,00

Las actividades vienen expresadas en n mol/min/mg. Para el estudio enzimático de este fraccionamiento se utilizaron cuatro ratas.

4.1.1.2.- Espectro de citocromos

Se ha realizado el estudio de espectros de citocromos de mitocondrias libres y sinápticas en ratas de 130 días. La cuantificación de los distintos tipos se hizo por triangulación, utilizando como línea base la trazada entre 540-575-640 nm, y calculando las densidades ópticas a los máximos de absorción de las bandas de citocromo a (605 nm), citocromo b (565 nm) y citocromo c (555 nm).

En la Tabla III se describen los resultados obtenidos, encontrando un mayor contenido en citocromos en la fracción de mitocondrias sinápticas, siendo el citocromo b el que alcanza unos valores menores en ambas fracciones mitocondriales. Sus perfiles, no presentan diferencias notables (fig. 1).

TABLA III

CUANTIFICACION DE ESPECTROS DE CITOCROMO EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

	Mitocondrias Libres	Mitocondrias Sinaptica
Citocromo a	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$
Citocromo b	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-3}$
Citocromo c	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-3}$

Los resultados están expresados en $\Delta DO/mg$ proteina mitocondrial.

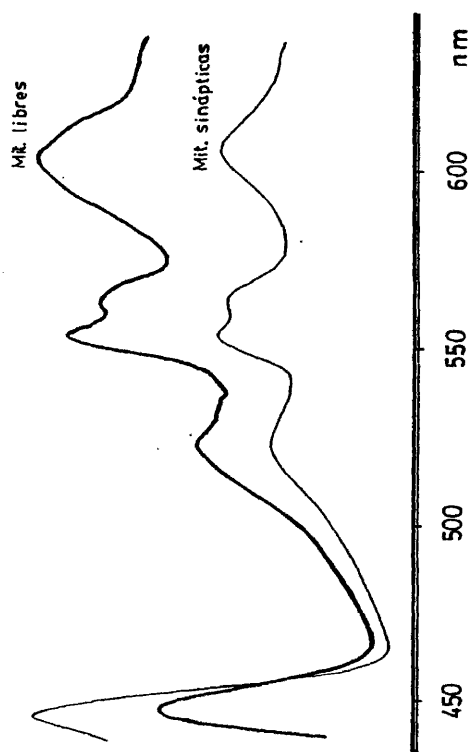


Fig. 1.- ESPECTRO DE CITOCROMOS A 25° C DE MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

4.1.1.3.- Respiración

La funcionalidad de la mitocondria viene definida por su capacidad de oxidar a distintos sustratos, siendo un buen índice la razón de control respiratorio (RCR). La hiperosmotividad a que es sometida la mitocondria en los gradientes de sacarosa junto con las altas fuerzas de centrifugación originan una pérdida del control respiratorio, Whittaker (1969a), siendo necesario realizar un "curado" para restaurar su funcionalidad, por ello los precipitados mitocondriales se han resuspendido en medio de aislamiento con BSA al 0,5 % para poder realizar ensayos respiratorios. Los resultados obtenidos con distintos sustratos se describen en la Tabla IV. De los sustratos ensayados, el succinato ha sido el mejor utilizado con un RCR de 2, tanto en mitocondria libre como en sináptica. A su vez el aumento en la concentración de potasio en el medio de respiración supone un mayor consumo de oxígeno, este efecto estimulador del potasio ha sido descrito por Kini y Quastel (1959) y Ozawa y col. (1967).

TABLA IV

RESPIRACION DE MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

Sustrato	Conc. K^+	Mitocondria libre		Mitocondria sinap.	
	mM	Estado 3	RCR	Estado 3	RCR
Succinato 10 mM	5	212	2,00	183	1,61
	100	266	1,90	191	1,98
Piruvato 5 mM +					
malato 2,5 mM	5	100	1,51	104	1,70
	100	206	1,54	130	1,49
Glutamato 5 mM +					
malato 2,5 mM	5	133	1,43	70	1,34
	100	148	1,70	87	1,24

Los resultados están expresados en n átomos de O_2 /min/mg proteína mitocondrial.

4.1.1.4.- Determinaciones de RNA y DNA

Las valoraciones de RNA y DNA fueron colorimétricas como se ha descrito en "Material y Métodos". En los primeros ensayos se obtuvieron valores excesivamente elevados debido a lípidos contaminantes de las preparaciones mitocondriales que interferían la reacción colorimétrica (Tabla V). Por ello se realizaron una serie de lavados con alcohol de distinta concentración, 70 %, 90 % y etanol absoluto, al precipitado de proteínas mitocondriales obtenido tras la adición del TCA al 10 %, centrifugando después de cada lavado a 3000 r.p.m., 10 min., después de este tratamiento las soluciones problemas fueron perfectamente comparables con los patrones, obteniéndose unos valores en mitocondrias libres tanto para DNA como para RNA, superiores a las encontradas en mitocondrias sinápticas.

TABLA V

DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

	<u>Mitocondria libre</u>		<u>Mitocondria sináptica</u>	
	RNA	DNA	RNA	DNA
Sin purificación del precipitado en TCA				
10 %	53,0	15,10	24,3	13,500
Con purificación del precipitado en TCA				
10 %	16,6	2,13	10,2	0,338

Los datos estan expresados en $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteina mi
tocondrial.

4.1.2.- Incorporación de Leucina tritiada en cortes de cerebro

El empleo de cortes de cerebro para estudiar distintos aspectos metabólicos surgió a partir de las observaciones de Mc Ilwain en 1963 y 1971, al comprobar que la estimulación eléctrica en cortes de cerebro producía una alteración en el consumo de oxígeno y en el metabolismo energético. El objetivo de estos experimentos fue estudiar la biosíntesis proteica mitocondrial al incubar los cortes de cerebro en presencia de ^3H Leucina, midiendo la radioactividad en las fracciones mitocondriales. En la Tabla VI se describen los resultados encontrados destacando la mayor incorporación en la fracción de mitocondrias libres frente a mitocondrias sinápticas. A su vez se ha observado el efecto de antibióticos sobre la incorporación utilizando la cicloheximida como inhibidor específico de la biosíntesis proteica citoplásmica, y el cloranfenicol, inhibidor del sistema biosintético mitocondrial (Hernández y col., 1971; Deanin y Gordon, 1973; Mahler, 1973). El empleo de los mismos se realizó añadiéndolos al medio de incubación a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ antes de la adición de la leucina tritiada. Tanto en mitocondrias libres como en sinápticas la cicloheximida ha tenido un escaso efecto inhibitor, el 4,2 % y el 14,9 % respectivamente, mientras que el cloranfenicol ha alcanzado una inhibición del 60 % y del 45 % respectivamente. Tabla VII.

TABLA VI

INCORPORACION POR CORTES DE CEREBRO DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
p mol/mg/h	0,0339 \pm 0,026	0,0198 \pm 0,006
	(n = 11)	(n = 9)

TABLA VII

INCORPORACION POR CORTES DE CEREBRO DE LEUCINA TRITIADA EN PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA. PORCENTAJES DE INHIBICION.

	<u>Mitocondria libre</u>	<u>Mitocondria sináptica</u>
Control	-----	-----
Cloranfenicol	60 %	45 %
Cicloheximida	4,2 %	14,9%

4.1.3.- EXPERIMENTOS " IN VIVO"

4.1.3.1.- Estudio de la incorporación del isótopo a lo largo del proceso

50 minutos después de la administración de leucina tritiada, se decapitó a las ratas y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener mitocondrias libres y sinápticas. En cada uno de los pasos de la preparación se recogieron alícuotas y se midió la radioactividad (Tabla VIII). Hay que destacar la alta radioactividad específica en los sobrenadantes de las dos primeras centrifugaciones a 17.000 g, 594 y 780 c.p.m./mg, representando el 30,8 % de la radioactividad total, y los bajos valores en los otros dos sobrenadantes de los lavados, 222 y 128 c.p.m./mg, significando el 7,8 % de la radioactividad total.

La fracción de sinaptosomas posee una radioactividad específica de 623 c.p.m./mg y supone el 19,2 % de la del homogenado. La radioactividad específica en mitocondrias libres y sinápticas es prácticamente la misma significando el 0,8 % y el 0,9 % de la radioactividad total respectivamente.

4.1.3.2.- Incorporación "in vivo" de Leucina tritiada en mitocondria libre y sináptica en función del tiempo

Se ha realizado una serie de ensayos determinando la radioactividad en las dos fracciones mitocondriales en pulsos de distinta duración, tras la administración de 20 μ Ci de ^3H Leucina por rata, empleándose al menos dos ratas en cada experimento (Tabla IX) (Figura 2). En la fracción de mitocondrias

TABLA VIII

RADIOACTIVIDAD A LO LARGO DEL FRACCIONAMIENTO

	cpm/mg	cpm/fracción
Homogenado	556	177920
Núcleo	319	60610
Sobrenadante 17.000 g	594	23760
Sobrenadante 1º lavado	780	31200
Sobrenadante 2º lavado	222	8880
Sobrenadante 3º lavado	128	5120
Crudo mitocondrial	300	24000
Mielina	142	3124
Sináptosomas	623	34265
Mitocondria libre	476	1428
"Gosh" sináptosomas	228	1368
Mitocondria sináptica	482	1607

libres la incorporación aumenta hasta alcanzar un máximo a las 13,3 horas, iniciándose un descenso que se hace mínimo a las 37,5 horas para mantenerse en un estado estacionario. La fracción de mitocondrias sinápticas tiene una evolución semejante a la fracción de mitocondrias libres durante las 3 primeras horas para alcanzar un mínimo a las 13,3 horas, y recuperar a las 22 horas unos valores de radioactividad próximos a mitocondrias libres. A partir de este punto la evolución es semejante en las dos fracciones mitocondriales.

4.1.3.3.- Efecto de la concentración de Leucina en la incorporación

Se ha utilizado ^3H -Leucina de distinta actividad específica, 50 Ci/mmol y 135 Ci/mmol, administrándose la misma cantidad de isótopo, para estudiar si trabajábamos en unas condiciones de saturación. En la Tabla X, se observa una linealidad entre concentración administrada y leucina incorporada. Estos ensayos se han realizado en pulsos de 3 horas.

4.1.3.4.- Experimentos de pulso-caza

En esta serie de experimentos se pretendía parar la incorporación de radioactividad a distintos tiempos para una posterior localización de la misma en las distintas fracciones. La incorporación se paraba por dilución isotópica, tras la administración de 11,25 mg de L-leucina fría al finalizar el tiempo de pulso por vía intraperitoneal, ya que este aminoácido tiene gran facilidad para difundir en el cerebro (Cristensen, 1972 ; Wade y Katzman, 1975; Yudilevich y col., 1972). Para comprobar

TABLA IX

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA.

Horas	Mitocondrias libres	Mitocondria sináptica	Número experime.
0,083	154 \pm 11	142 \pm 8	(2)
0,83	482 \pm 0	482 \pm 0	(1)
3	1050 \pm 200	835 \pm 38	(3)
6	1035 \pm 62	660 \pm 50	(2)
13,33	1214 \pm 30	472 \pm 41	(2)
22	884 \pm 135	755 \pm 85	(6)
37,5	456 \pm 22	379 \pm 29	(2)
48	471 \pm 0	289 \pm 0	(1)
70	461 \pm 0	503 \pm 0	(1)

Los valores estan expresados en cpm/mg.

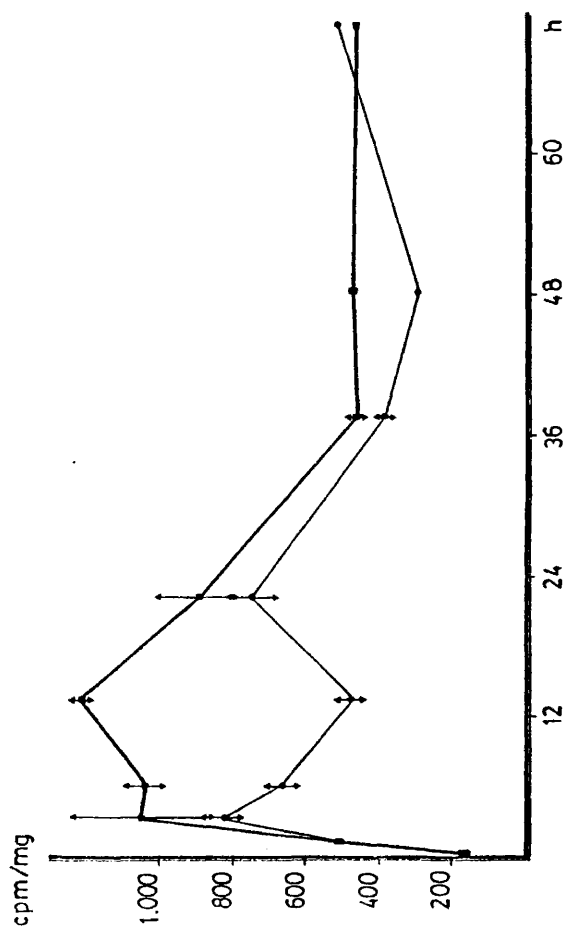


Fig. 2.- INCORPORACION "IN VIVO" DE ^3H -LEUCINA EN MITOCONDRIAS LIBRES (—●—) Y SINAPTICAS (---●---) AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

TABLA X

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LEUCINA TRITIADA EN LA INCORPORACION "IN VIVO" EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

	Concentración Leucina	Mitocondria Libre	Mitocondria Sináptica
Leucina 46-60 Ci	0,4 nmol	0,0615	0,0484
Leucina 135 Ci	0,148 nmol	0,0255	0,016

La radioactividad está expresada en pmol/mg.

el efecto de dilución originado por la leucina fría se realizó un experimento inyectándola una hora antes de administrar la leucina tritiada y sacrificando a las ratas a las 22 horas (Tabla XI), apareciendo una inhibición del 68,6 % y 58,5 % en mitocondrias libres y sinápticas respectivamente. En los experimentos de pulso-caza se ha administrado leucina fría a las 3 horas, 8 horas, y 10 1/2 horas por vía intraperitoneal y se ha determinado la radioactividad a las 22 horas en las dos fracciones mitocondriales. En la fracción de mitocondria libre ha habido una disminución de la radioactividad en los tres tiempos estudiados del 13,4 %, 18,5 % y 17,1 % respectivamente, mientras que en la fracción de mitocondrias sinápticas a 3 horas ha habido un aumento del 4,6 % y en los otros tiempos una disminución del 3,9 % y 6,1 % a las 8 horas y 10 1/2 horas (Tabla XII, Figura 3).

4.1.3.5.- Efecto de antibióticos en la incorporación

a) Administración de antibióticos intraperitonealmente

Se ha estudiado el efecto de los antibióticos, cicloheximida y cloranfenicol, siendo inhibidores específicos de la biosíntesis proteica citoplásmica y mitocondrial respectivamente. Ambos antibióticos son susceptibles de pasar la barrera hematorraquídea por lo que se pueden aplicar por vía intraperitoneal (Siegel y col., 1976).

Las dosis utilizadas han sido 60 mg/100 g de peso para el cloranfenicol (Firkin, 1969) y 4 mg/Kg de peso para la cicloheximida (CH'IH y col., 1978). Los antibióticos solubilizados en suero fisiológico se han administrado una hora antes

TABLA XI

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION INTRAPERITONEAL DE LEUCINA FRIA EN LA INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
Ratas controles	918	828
Ratas tratadas	288	343
% inhibición	68,6	58,5

El pulso fue de 22 horas previa administración de leucina fría una hora antes.

La radioactividad está expresada en cpm/mg

TABLA XII

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA EN EXPERIMENTOS DE PULSO-CAZA.

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
Control	884 \pm 135	755 \pm 85
Pulso de 3 horas; caza de 22 horas	766	790
Pulso de 8 horas; caza de 22 horas	721	726
Pulso de 10 1/2 horas; caza de 22 horas	733	709

La radioactividad está expresada en cpm/mg

100

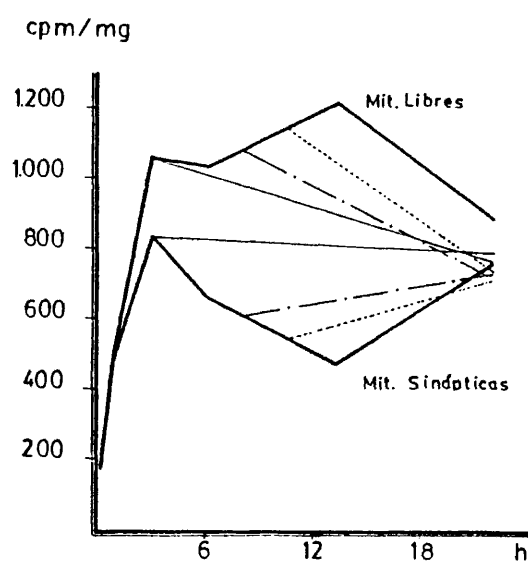


Fig. 3.- REPRESENTACION DE LOS EXPERIMENTOS DE PULSO-CAZA. EL TRAZO GRUESO CORRESPONDE A LA FIGURA 2, EL FINO VA DESDE EL PUNTO DE ADMINISTRACION DE LEUCINA FRIA A LAS 3 h (—), 8 h (— . —), y 10 $\frac{1}{2}$ h (.....) HASTA EL MOMENTO DEL SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.

de la aplicación de la leucina tritiada. Se tomaron muestras de los sobrenadantes postmitocondriales de ratas tratadas con ambos antibióticos (Tabla XIII), encontrando una mayor inhibición en las tratadas con cicloheximida.

En la Tabla XIV se describe el tanto % de inhibición de cicloheximida y cloranfenicol administrados intraperitonealmente 1 hora antes de la aplicación de leucina tritiada y sacrificadas a las 3 horas de pulso. El cloranfenicol produjo una inhibición del 14,6 % y 11,3 % en la fracción de mitocondrias libres y sinápticas respectivamente, mientras que la cicloheximida causó un 75 y 70,6 % en cada fracción.

b) Administración de antibióticos por inyección intracerebroventricular

En este experimento se planteó el estudiar el efecto de los antibióticos teniendo la certeza que se alcanzaba una rápida y alta concentración de los mismos en el cerebro, por ello se acudió a la administración intraventricular, siguiendo la pauta de Ramírez (1973), para ello se administró 2,85 mg de cloranfenicol y 0,717 mg de cicloheximida, a los 15 minutos se aplicó la leucina tritiada sacrificando a las ratas a los 20 minutos en el caso del cloranfenicol y 50 minutos en el caso de la cicloheximida. La inhibición de la biosíntesis proteica mitocondrial por el cloranfenicol ha sido muy importante alcanzando el 74 % y 91,5 % en mitocondrias libres y sinápticas respectivamente (Tabla XV). La cicloheximida produjo una inhibición del 62,2 % y 77,6 % respectivamente, siendo estos valores semejantes a los encontrados tras la administración intraperitoneal.

TABLA XIII

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN LOS SOBRENADANTES
POSTMITOCONDRIALES TRAS LA ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS POR
VIA INTRAPERITONEAL.

	cpm por fracción	% inhibición
Control	15767	----
Cicloheximida	1367	91,3
Cloranfenicol	2767	82,4

Los resultados estan expresados en cpm/fracción.

TABLA XIV

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS
TRAS LA ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS POR VIA INTRAPERITO-
NEAL.

	Mitocondria libre		Mitocondria sináptica	
Control	778	(---)	839	(---)
Cicloheximida	195	(75)	247	(70,6)
Cloranfenicol	665	(14,6)	745	(11,3)

Los resultados se expresan en cpm/mg proteína.

Entre paréntesis se expresa el % de inhibición.

10h

TABLA XV

INCORPORACION "IN.VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS
TRAS LA ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS POR VIA INTRAVENTRICU-
LAR.

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
Control 20 minutos	200 (----)	200 (----)
Control 50 minutos	476 (----)	482 (----)
Cloranfenicol	52 (74)	17 (91,5)
Cicloheximida	180 (62,2)	108 (77,6)

Los datos estan expresados en cpm/mg de proteina.
Entre paréntesis se indica el % de inhibición.

4.1.3.6.- Inhibidores del transporte axoplásmico

La contribución del transporte axoplásmico como aporte de macromoléculas y orgánulos celulares como mitocondrias y lisosomas a la terminación nerviosa, ha sido puesta de manifiesto en numerosas publicaciones (Barondes, 1973; Jeffrey, y Austin, 1973; Iasek, 1970; Grafstein, 1969; y Lubinska, 1975). Se ha utilizado un inhibidor de este transporte, la colchicina, (Fernández y col., 1970; Banks y col., 1971) administrando 0,15 mg cuatro horas después de la aplicación de leucina tritiada y sacrificando a las ratas a las 22 horas. En la fracción de mitocondria libre se ha obtenido una inhibición del 20,9 % y en la de sinápticas del 31 % (Tabla XVI). Figura 4.

TABLA XVI

EFFECTO DE LA COLCHICINA EN LA INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

	Mitocondrias libres	Mitocondrias sinápticas
Ratas controles	705	670
Ratas tratadas	557	462
% inhibición	20,9	31,0

Los resultados estan expresados en cpm/mg de proteina.

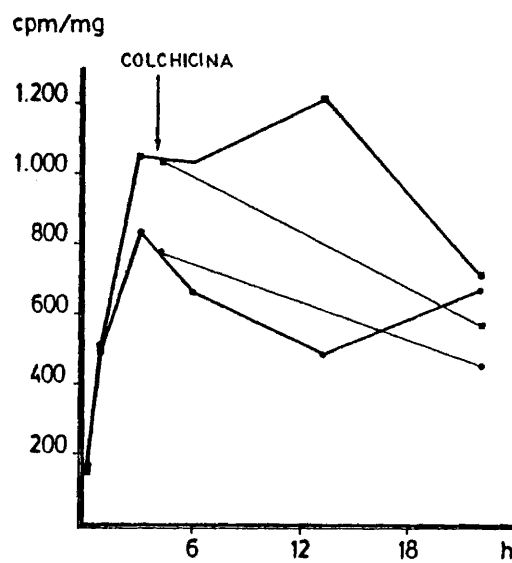


Fig. 4.- EFECTO DE LA COLCHICINA EN LA INCORPORACION "IN VIVO" DE ^3H -LEUCINA EN MITOCONDRIAS LIBRES (—■—) Y SINAPTICAS (—●—) AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA. EL TRAZO GRUESO CORRESPONDE AL CONTROL (Fig. 2), EL FINO VA DESDE EL PUNTO DE APLICACION DE COLCHICINA HASTA EL MOMENTO DEL SACRIFICIO.

4.2.- EXPERIENCIAS "IN VITRO"

4.2.1.- Mitocondrias "Clark and Nicklas"

4.2.1.1.- Caracterización de la fracción de mitocondrias "Clark and Nicklas"

Se ha utilizado enzimas marcadores de contaminantes y de mitocondrias. En la Tabla XVII se describen las actividades enzimáticas totales, en homogenado y en mitocondrias. La actividad lactato deshidrogenasa (marcador citoplásmico) representa el 0,26 % de la actividad total y la actividad acetilcolinesterasa (marcador de membrana) supone el 0,98 % de la actividad del homogenado, en la fracción mitocondrial, Las actividades enzimáticas específicas de estos enzimas son de $164 \pm 27,5$ (5) nmoles/min/mg en presencia de Triton para LDH y $50 \pm 0,9(5)$ nmoles/min/mg para acetil colinesterasa (Tabla XVIII). La actividad citrato sintasa supone un 4,69 % de la actividad total en mitocondrias con una actividad enzimática específica de $720,4 \pm 190$ (2) nmoles/min/mg. El rendimiento en proteínas de la fracción mitocondrial es del 1,1 %.

4.2.1.2.- Incorporación "in vitro" de leucina tritiada en mitocondrias "Clark and Nicklas"

Dada la alta funcionalidad de estas mitocondrias ("Clark and Nicklas, 1970"), se estudió la incorporación de ^3H leucina, utilizando como medio de incubación, el medio 100 mM K^+ , ya que en dicho medio se han alcanzado los valores de respiración más altos y dada la relación estrecha entre producción

TABLA XVII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS TOTALES EN EL FRACCIONAMIENTO "CLARK AND NICKLAS".

	Homogenado	Mitocondria (C & N)
Lactato DH	828,5 \pm 217 (5)	1,322 \pm 0,6 (5)
Lactato DH Triton	1345 \pm 362 (5)	3,6 \pm 0,9 (5)
Acetilcolinesterasa	122,16 \pm 21,1(5)	1,209 \pm 0,13(5)
Citrato sintasa	362,89 \pm 18,2(2)	17,05 \pm 0,71(2)
Proteinas en mg	2038 \pm 173 (5)	22,44 \pm 6,68(5)

Los resultados estan expresados en μ mol/min/volumen fracción.

TABLA XVIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS EN EL FRACCIONAMIENTO "CLARK AND NICKLAS".

	Homogenado	Mitocondrias (C & N)
Lactato deshidrogenasa	410 \pm 130 (5)	51 \pm 16 (5)
Lactato DH Triton	664 \pm 0,2(5)	164 \pm 27,5 (5)
Acetilcolinesterasa	603 \pm 15 (5)	50 \pm 0,9 (5)
Citrato sintasa	169 \pm 1,7(2)	720,4 \pm 190 (2)

Los resultados estan expresados en nmol/min/mg.

de ATP y biosíntesis proteica se optó por la selección de dicho medio. Hay una serie de características que se deben cumplir para caracterizar una verdadera incorporación de aminoácidos marcados en proteínas mitocondriales como es una relación directa entre incorporación y tiempo de incubación. A su vez la incorporación será sensible a antibióticos inhibidores de la biosíntesis proteica mitocondrial (cloranfenicol) y resistente a inhibidores de la biosíntesis proteica citoplásmica (cicloheximida) . En la figura 5 se describe la incorporación frente al tiempo siendo lineal durante 45 minutos y alcanzando unos valores de $0,757 \pm 0,01$ (3) pmol/mg/hora (Tabla XIX).

Cuando se añade al medio de incubación cloranfenicol 100 μ g/ml, la incorporación queda inhibida en un 82,5 % después de una hora de incubación, no obstante si la adición ha sido de cicloheximida 100 μ g/ml no existe inhibición (Tabla XX).



112

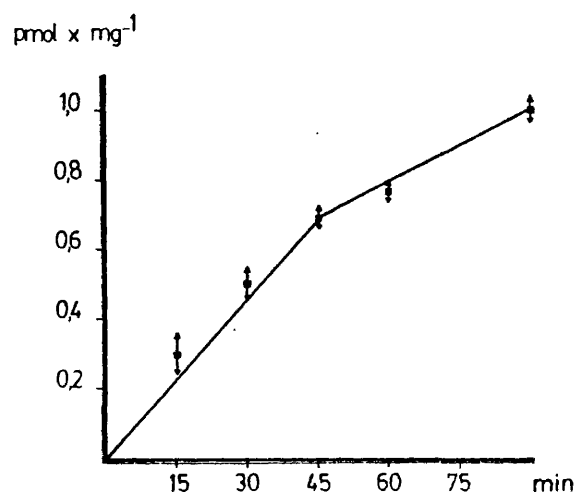


Fig. 5.- INCORPORACION "IN VITRO" DE ^3H -LEUCINA
POR MITOCONDRIAS CLARK Y NICKLAS.

TABLA XIX

INCORPORACION "IN VITRO" DE LEUCINA TRITIADA POR MITOCONDRIAS
"CLARK AND NICKLAS".

Tiempo	pmol/mg
15 minutos	0,309 \pm 0,06 (3)
30 minutos	0,507 \pm 0,05 (3)
45 minutos	0,697 \pm 0,03 (3)
60 minutos	0,757 \pm 0,01 (3)
90 minutos	0,998 \pm 0,04 (2)

La radioactividad utilizada por experimento ha
sido $2\mu\text{Ci/ml}/2,82 \pm 0,6\text{ mg.}$

TABLA XX

EFFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE LEUCINA TRITIADA POR MITOCONDRIAS "CLARK AND NICKLAS".

	30 minutos	60 minutos
Control	0,59 (----)	0,744 (----)
Cloranfenicol	0,13 (77,9)	0,13 (82,5)
Cicloheximida	0,503 (14,7)	0,791 (-6,3)

Los datos estan expresados en pmol/mg. Entre paréntesis se indica el % de inhibición.

4.2.2.- Mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll.

4.2.2.1.- Estudio enzimático a lo largo del fraccionamiento por gradiente discontinuo de Ficoll.

Durante la preparación de mitocondrias libres y sinápticas se han recogido alícuotas de cada fracción para determinar las actividades de los enzimas marcadores. En la Tabla XXI aparecen las actividades enzimáticas totales por fracción. La actividad lactato deshidrogenasa se encuentra fundamentalmente localizada en el sobrenadante postmitocondrial siendo el 42,87 % de la actividad del homogenado, en mitocondrias libres y sinápticas representa 0,13 % y el 0,085 % de la actividad total.

La actividad acetilcolinesterasa significa en mitocondrias libres y sináptica el 0,37 % y el 0,2 % de la actividad del homogenado respectivamente, a su vez la actividad citrato sintasa supone el 8,1 % y el 1,72 % de la actividad total respectivamente.

En la Tabla XXII estan descritas las actividades enzimáticas específicas, destacando los bajos valores de los enzimas marcadores citoplásmicos, 43 ± 20 (11) y 98 ± 36 nmol/min/mg, y de membranas, 20 ± 7 (13) y 51 ± 22 (6), para mitocondrias libres y sinápticas respectivamente y obteniendo unos valores altos en citrato sintasa, 856 ± 246 (8) y 680 ± 200 (6) respectivamente. El rendimiento en proteínas es del 1,17 % para mitocondria libre y el 0,3 % para mitocondria sináptica.

TABLA XXI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS TOTALES DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintasa	Protei- na
Homogenado	786,4 ± 162(6)	1176,8 ± 212(6)	188,7 ± 12(6)	381,2 ± 80(6)	3281 ± 160(7)
Núcleo	110,8 ± 44 (6)	232,5 ± 40 (6)	58,1 ± 10(6)	119,8 ± 20(6)	1333 ± 253(7)
Crudo mitocon- drial	93,8 ± 39 (6)	273,1 ± 55 (6)	81,2 ± 6(6)	193,7 ± 18(6)	1412 ± 183(7)
Sobrenadante postmitocon.	486,2 ± 226(4)	504,6 ± 248(4)	31 ± 2 (4)	13,4 ± 1 (4)	745 ± 100(5)
Lisado	78,7 ± 15 (5)	132 ± 23 (5)	41,5 ± 7 (5)	60,8 ± 10(5)	357 ± 42(6)
Mitocondrias libres	1,21 ± 1 (6)	1,6 ± 0,9(6)	0,717 ± 0,2(6)	30,9 ± 8 (6)	38 ± 7(7)
Mitocondrias sinápticas	0,43 ± 0,4(6)	1,01 ± 0,49(6)	0,39 ± 0,07(6)	6,59 ± 1 (5)	10 ± 2(7)

Los datos estan expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{volumen}$ fracción. Entre paréntesis está indicado el número de experimentos.

117

TABLA XXII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS DEL FRACCIONAMIENTO POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintasa
Homogenado	271 \pm 90(6)	362 \pm 69(6)	60 \pm 8 (7)	118 \pm 28(6)
Núcleo	92 \pm 54(6)	190 \pm 60(6)	46 \pm 10 (5)	96 \pm 24(6)
Crudo mitocondrial	66 \pm 37(6)	190 \pm 43(6)	67 \pm 28 (6)	139 \pm 28(6)
Sobrenadante postmitoc.	660 \pm 450(4)	690 \pm 500(4)	39 \pm 9 (4)	16 \pm 2(4)
Lisado	204 \pm 40(6)	350 \pm 60(5)	109 \pm 34 (5)	157 \pm 43(5)
Mitocondrias libres	33 \pm 19(11)	43 \pm 20(11)	20 \pm 7(13)	856 \pm 246(8)
Mitocondrias sinápticas	38 \pm 34(6)	98 \pm 36(6)	51 \pm 22 (6)	680 \pm 200(6)

Los datos estan expresados en nmol/min/mg.

Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

4.2.2.2.- Ensayos respiratorios en mitocondrias libres y sinápticas.

Una vez determinada la pureza de nuestras fracciones mitocondriales, estudiamos su funcionalidad midiendo la capacidad respiratoria frente a distintos sustratos oxidables. Se ha determinado la razón de control respiratorio (RCR), índice cinético que mide la estimulación respiratoria por efecto de ADP y posterior recuperación (el control respiratorio) y que es totalmente dependiente de la integridad de la mitocondria y el cociente P:O, siendo éste el parámetro que mejor define la capacidad funcional de una preparación mitocondrial ya que es el índice de la fosforilación oxidativa.

En las Tablas XXIII y XXIV, estan reflejados los valores obtenidos por mitocondrias libres y sinápticas frente a distintos sustratos, en medio de respiración 100 mM K^+ destacando las altas RCR y buenos valores del cociente P:O, encontrando 2,81 y 3,1 para mitocondrias libres y sinápticas respectivamente en piruvato + malato y 1,83 para mitocondrias libres en presencia de succinato. En las Tablas XXV y XXVI se describen los resultados respiratorios en el mismo medio de incubación con Cl_2Mg 3 mM, apareciendo bajos valores para piruvato + malato y glutamato + malato con RCR menores de 2, salvo para el succinato que se encuentra elevado.

TABLA XXIII

RESPIRACION EN AUSENCIA DE Mg^{2+} DE MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS
POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Sustrato	Estado 4	Estado 3	RCR	P/O
Piruvato 5 mM + malato 2,5 mM	39,9 \pm 4,9 (7)	157,35 \pm 12 (7)	3,95	2,81
Succinato 10 mM	35,86 \pm 6 (3)	113,36 \pm 17,9 (3)	3,17	1,83
Glutamato 5 mM + malato 2,5 mM	23,7 \pm 2,3 (3)	60,3 \pm 6,2 (3)	2,58	----

Todos los ensayos se realizaron a 37° C. Los resultados estan expresados en natomos O_2 /min/mg. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

TABLA XXIV

RESPIRACION EN AUSENCIA DE Mg^{2+} DE MITOCONDRIAS SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Sustrato	Estado 4	Estado 3	RCR	P/O
Piruvato 5 mM + malato 2,5 mM	31,4 \pm 3,6 (4)	122,75 \pm 12,8 (4)	3,9	3,1
Succinato 10 mM	35,0 \pm 0 (2)	86,00 \pm 0 (2)	2,45	---
Glutamato 5 mM + malato 2,5 mM	14,3 \pm 3,4 (4)	41,67 \pm 1,3 (4)	3,07	---

Todos los ensayos se realizaron a 37° C. Los resultados estan expresados en n atomos de O_2 /min/mg. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

TABLA XXV

RESPIRACION EN PRESENCIA DE Mg^{2+} DE MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS
POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Sustrato	Estado 4	Estado 3	RCR
Piruvato 5 mM + malato 2,5 mM	$11,30 \pm 1,7$ (6)	$18,63 \pm 9,2$ (6)	1,68
Succinato 10 mM	$18,05 \pm 7$ (4)	$94,40 \pm 63,8$ (4)	4,96
Glutamato 5 mM + malato 2,5 mM	$33,60 \pm 0$ (2)	$35,80 \pm 0$ (2)	1,07

Todos los ensayos se realizaron a 37° C. Los resultados estan expresados en n atomos de O_2 /min/mg. Entre paréntesis se describe el número de experimentos.

TABLA XXVI

RESPIRACION EN PRESENCIA DE Mg^{2+} DE MITOCONDRIAS SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Sustrato	Estado 4	Estado 3	RCR
Piruvato 5 mM + malato 2,5 mM	11,14 \pm 2,3 (4)	20,00 \pm 12 (4)	1,8
Succinato 10 mM	16,17 \pm 5,4 (3)	52,56 \pm 20 (3)	3,2

Los ensayos se han realizado a 37° C. Los resultados estan expresados en n atomos de O_2 /min/mg.

Entre paréntesis se describe el número de experimentos.

4.2.2.3.- Incorporación "in vitro" de leucina tritiada en mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll.

Desde el hallazgo de Mc Lean (1958), comprobando que la mitocondria aislada era capaz de incorporar aminoácidos marcados en sistemas "in vitro", nuevos trabajos se han realizado para estudiar este aspecto en distintos tejidos animales, vegetales y microorganismos. La biosíntesis proteica mitocondrial adquiere un aspecto especial en cerebro, dada la existencia de dos poblaciones mitocondriales bien definidas, mitocondrias libres y sinápticas. El objeto de esta serie de experimentos ha sido estudiar en nuestras fracciones la posible existencia de diferencias en la capacidad biosintética entre las dos poblaciones.

Los valores encontrados en la incorporación frente a tiempo en medio de incubación 100 mM K^+ , utilizando fuente exógena de energía (Tabla XXVII), sugieren una mayor actividad biosintética en la fracción de mitocondrias libres (Figura 6). El proceso es inhibido por cloranfenicol a concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ después de una hora de incubación en un 77,1 % y 71,2 % para mitocondrias libres y sinápticas respectivamente, no apreciándose inhibición por la cicloheximida a la misma concentración en ninguna de las fracciones (Tabla XXVIII).

Dada la buena actividad respiratoria encontrada en las dos fracciones mitocondriales se estudió la incorporación sustituyendo el sistema exógeno de producción de energía por la adición de sustratos oxidables, ensayándose sucinato,

124

TABLA XXVII

INCORPORACION "IN VITRO" FRENTE AL TIEMPO DE LEUCINA TRITIADA
EN MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DIS-
CONTINUO DE FICOLL.

Tiempo	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
15 minutos	0,305 \pm 0,03 (2)	0,173 \pm 0,05 (2)
30 minutos	0,493 \pm 0,08 (4)	0,289 \pm 0,1 (2)
45 minutos	0,784 \pm 0,05 (2)	0,424 \pm 0,1 (2)
60 minutos	0,857 \pm 0,1 (4)	0,534 \pm 0,2 (4)

Los resultados estan expresados en p mql/mg, in-
dicando entre paréntesis el número de experimentos.

125

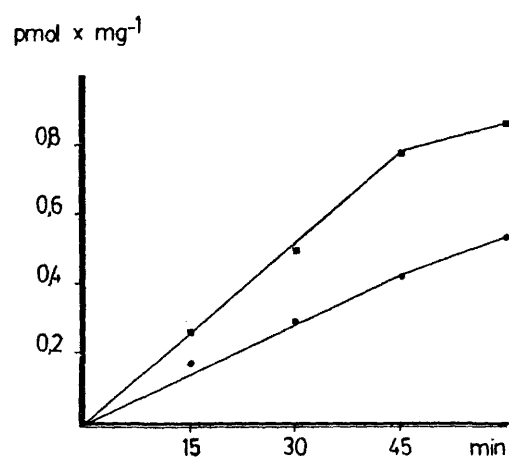


Fig. 6.- INCORPORACION "IN VITRO" DE ^3H -LEUCINA POR MITOCONDRIAS LIBRES (\blacksquare) Y SINAPTICAS (\bullet) AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

TABLA XXVIII

EFFECTO DE ANTIBIOTICOS EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

	Mitocondria libres	Mitocondria sináptica
Control	0,568 (----)	0,424 (----)
Cloranfenicol	0,130 (77,1)	0,122 (71,2)
Cicloheximida	0,593 (-4,4)	0,461 (-8,7)

Los datos estan expresados en pmol/mg/hora. Entre paréntesis se indica el % de inhibición.

piruvato + malato y glutamato + malato; en ambas fracciones se han obtenido en todos los casos una incorporación ligeramente menor que con el sistema exógeno, siendo el sustrato mejor utilizado glutamato + malato en ambas fracciones mitocondriales. La adición de ADP en presencia de estos sustratos aumenta la incorporación siendo muy significativa con succinato en las mitocondrias sinápticas y con piruvato + malato en las mitocondrias libres. A su vez en la sustitución de ADP por "trap" de hexoquinasa ha habido un estímulo de la incorporación importante en ambas fracciones. La incorporación con glutamato es semejante a la obtenida con el sistema generador de ATP no existiendo variación en la incorporación tras la adición de atractilosido (Tabla XXIX) (Figura 7).

Las condiciones de incubación descritas corresponden a un sistema no saturado como se deduce de la Tabla XXX, habiéndose realizado todos los experimentos a una concentración de leucina $0,02 \mu\text{M}$, que corresponde a $1 \mu\text{Ci/ml}$ de isótopo (Figura 8).

TABLA XXIX

EFEECTO DE LA UTILIZACION DE DIFERENTES SUSTRATOS OXIDABLES EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE LEUCINA TRITIADA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Sustrato	Mitocondria libre		Mitocondrias sináptica	
	Estado 4	Estado 3	Estado 4	Estado 3
Succinato 10 mM	0,09	0,103	0,232	0,566
Piruvato 10 mM + malato 2,5 mM	0,204	0,59	0,24	0,28
+ Trap hexoquinasa	----	0,37	----	0,307
Glutamato 10 mM + malato 2,5 mM	0,324	----	0,3175	----
+ Atractilósido	----	0,322	----	0,319

Los resultados estan expresados en pmol/mg/30 minutos.

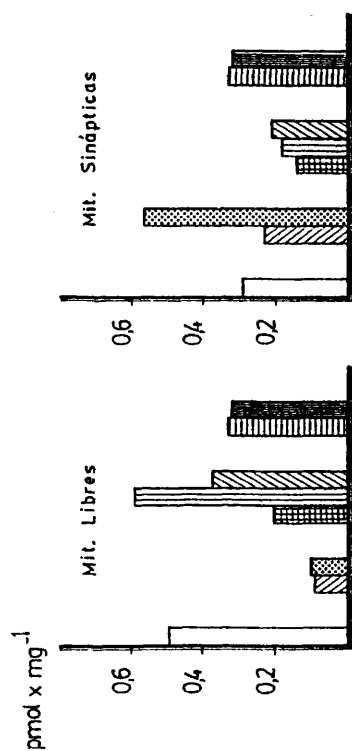


Fig. 7.- EFECTO DE LOS SUSTRATOS EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE ³H-LEUCINA POR MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOL. □ Control; ▨ Succinato + ADP; ▩ Piruvato + malato; ▤ Piruvato + malato + ADP; ▦ Piruvato + malato + "trap" de hexoquinasa; ■ Glutamato + malato; ■ Glutamato + malato + atractilósido.

TABLA XXX

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LEUCINA TRITIADA SOBRE LA INCORPORACION "IN VITRO" EN MITOCONDRIAS LIBRES, AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Concentración de ^3H Leucina en n moles/ml	30 minutos	60 minutos
0,02	0,253	0,378
0,04	0,527	0,814
0,08	1,11	1,592

La incorporación está expresada en p mol/mg proteína.

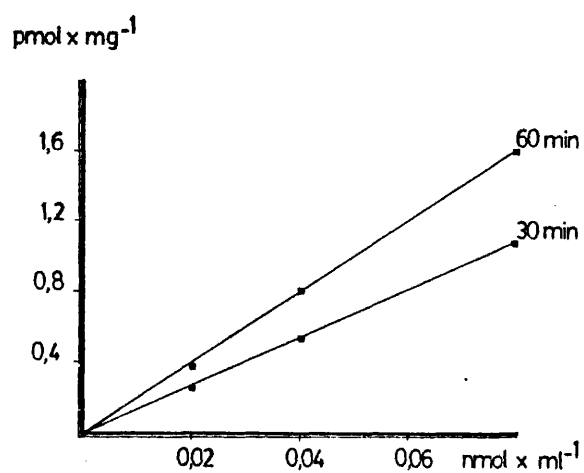


Fig. 3.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ³H-LEUCINA EN LA INCORPORACION "IN VITRO" POR MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

4.2.2.4.- Incorporación de ^{14}C -Leucina en mitocondrias libres y sinápticas obtenidas por gradiente discontinuo de Ficoll.

4.2.2.4.1.- Efecto del tiempo, concentración de leucina y antibióticos.

El empleo de radioisótopos C^{14} , supone eliminar los fenómenos de intercambio descritos para el ^3H , lográndose un aumento en la eficiencia del sistema, asimismo el uso de ^{14}C Leucina nos permite trabajar con unas concentraciones de leucina superiores a la leucina tritiada, de tal manera que la concentración de leucina usada ha sido de $2,049\mu\text{M}$ frente a $0,02\mu\text{M}$ de los ensayos con ^3H Leucina.

En la Tabla XXXI y Figura 9, se describen los resultados obtenidos de la incorporación frente al tiempo, como fuente de energía se ha empleado un sistema exógeno, generador de ATP. Los valores al cabo de una hora corresponden al orden de 2 pmoles/mg, significando un aumento de 250 % frente a la leucina tritiada.

En la Tabla XXXII se describe el efecto de la temperatura sobre la incorporación, obteniendo una mayor incorporación a 37°C , seleccionando ésta para el resto de los experimentos (Figura 10).

La incorporación es inhibida en un 83,0 % y 86,5 % en mitocondrias libres y sinápticas respectivamente por efecto del cloranfenicol, no existiendo inhibición alguna por ciclo

TABLA XXXI

INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS LIBRES
Y SINAPTICAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Tiempo	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
15 minutos	0,592 \pm 0,14 (2)	0,726 \pm 0,26 (2)
30 minutos	1,257 \pm 0,17 (2)	1,340 \pm 0,12 (2)
45 minutos	1,858 \pm 0,29 (2)	1,981 \pm 0,38 (2)
60 minutos	2,032 \pm 0,16 (2)	No determinado

Los resultados estan expresados en pmol/mg, indicando entre paréntesis el número de experimentos, habiendose realizado la incubación a 37° C.

138

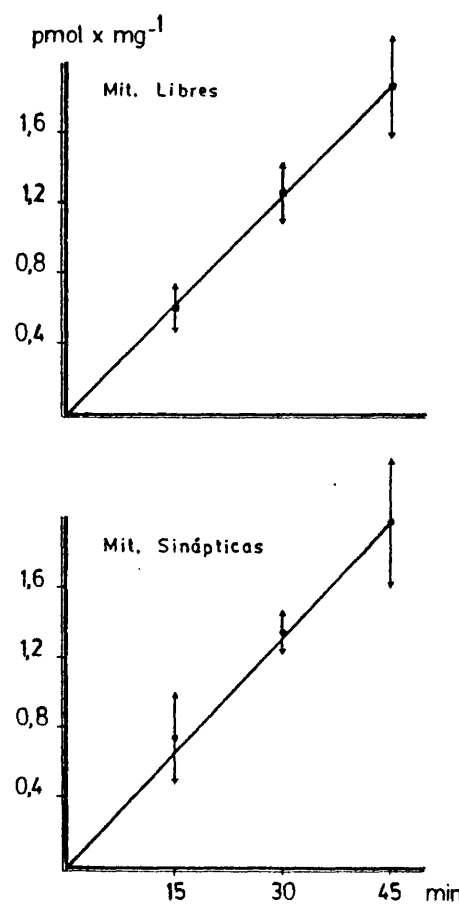


Fig. 9.- INCORPORACIÓN "IN VITRO" DE ^{14}C -LEUCINA POR MITOCONDRIAS LIBRES (—■—) Y SINÁPTICAS (—●—) AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

TABLA XXXII

INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIA LIBRE Y SINAPTICA AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

Tiempo	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
15 minutos	0,447	0,461
30 minutos	1,083	0,925
45 minutos	No determinado	1,303
60 minutos	2,193	1,895

Los resultados estan expresados en pmol/mg. La incubación se ha efectuado a 30° C.

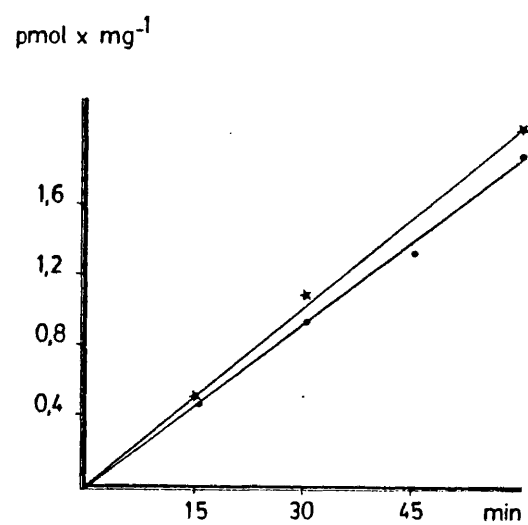


Fig. 10.- INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C -LEUCINA POR MITOCONDRIAS LIBRES OBTENIDAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL A 25° C (●) Y A 37° C (★).

heximida. El dinitrofenol, desacoplante mitocondrial, causó una inhibición del 25 % y 54,4 % respectivamente. También se estudió el efecto del ión Mg^{2+} encontrando una inhibición del 60 % y del 51,5 % respectivamente cuando se suprimía dicho ión del medio (Tabla XXXIII). En estas series de experimentos se tuvo un especial cuidado en la contaminación bacteriana, trabajándose en condiciones de semisterilidad y llevando controles una vez finalizada la incorporación. La contaminación no fue superior a 1000 colonias/ml en ningún caso. El conjunto de todos los factores, ^{14}C , mayor concentración de leucina, la presencia del ión Mg^{2+} en el medio y la ausencia de contaminación han contribuido a obtener una alta incorporación específica.

Se ha realizado un estudio de la influencia de la concentración de leucina en la incorporación (Tabla XXXIV). A concentraciones bajas de 2,4 y 4,8 nmoles/ml la incorporación es semejante en las dos fracciones mitocondriales, no ocurriendo así a concentraciones mayores, donde la mitocondria sináptica duplica su incorporación frente a las mitocondrias libres (Figura 11).

TABLA XXXIII

EFFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS, DNP, y Mg^{2+} EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
Control	1,517 (----)	1,415 (----)
Cloranfenicol	0,257 (83,0)	0,190 (86,5)
Cicloheximida	1,630 (-7,4)	1,718 (-21,4)
Dinitrofenol	1,137 (25)	0,645 (54,4)
Medio sin Mg^{2+}	0,606 (60)	0,686 (51,5)

La incorporación está expresada en pmol/mg/30 minutos, indicando entre paréntesis el % de inhibición.

TABLA XXXIV

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ^{14}C LEUCINA EN LA INCORPORACION "IN VITRO" EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FI-COLL.

nmoles/ml	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
2,458	1,472	1,080
4,896	2,880	2,799
9,823	4,186	14,886
14,749	9,168	18,927

Los resultados estan expresados en pmol/mg/30 mi nutos.

140

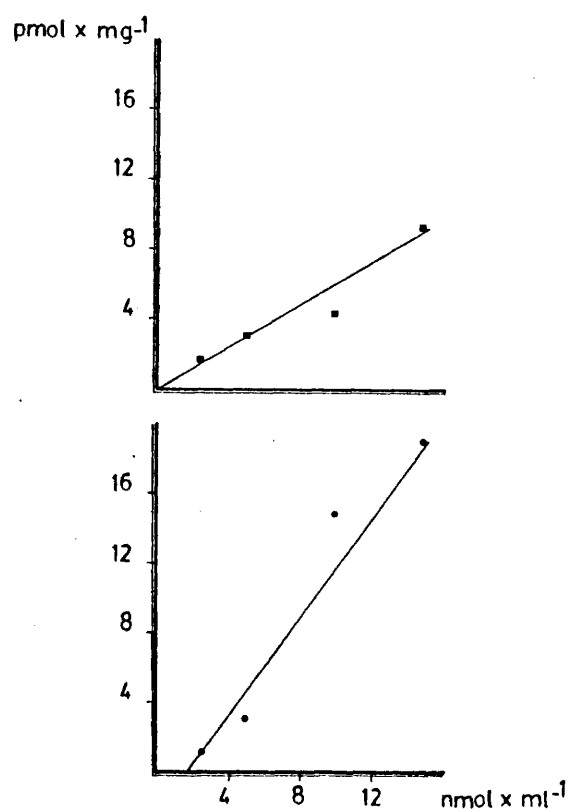


Fig. 11.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ¹⁴C-LEUCINA EN LA INCORPORACION "IN VITRO" POR MITOCONDRIAS LIBRES (—■) Y SINAPTICAS (—●) AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

4.2.2.4.2.- Incorporación de ^{14}C Leucina en presencia de distintos sustratos.

Se ha sustituido el sistema de aporte energético exógeno por sustratos oxidables como succinato, piruvato + malato y glutamato + malato, obteniendo en todos ellos en estado IV una incorporación inferior a la obtenida con el sistema exógeno excepto con glutamato + malato. En estado III, tras la adición de ADP 20 mM al medio de incubación se produjo un aumento significativo (Tabla XXXV) (Figura 12).

TABLA XXXV

INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL. EFECTO DE DIFERENTES SUS-TRATOS OXIDABLES.

	Mitocondria libre		Mitocondria sináptica	
	Estado IV	Estado III	Estado IV	Estado III
Succinato 10 mM	$1,28 \pm 0,2$ (2)	$2,53 \pm 0,5$ (2)	$1,11 \pm 0,6$ (2)	$1,66 \pm 0,5$ (2)
Piruvato 10 mM + malato 2,5 mM	$0,47 \pm 0,02$ (2)	$1,91 \pm 0,18$ (2)	$0,67 \pm 0,2$ (2)	$1,89 \pm 0$ (1)
Glutamato 10 mM + malato 2,5 mM	$1,87 \pm 0,4$ (2)	$3,46 \pm 0,4$ (2)	$1,50 \pm 0,1$ (3)	$3,24 \pm 0,3$ (3)

Los resultados estan expresados en pmol/mg/30 mi
nutos.

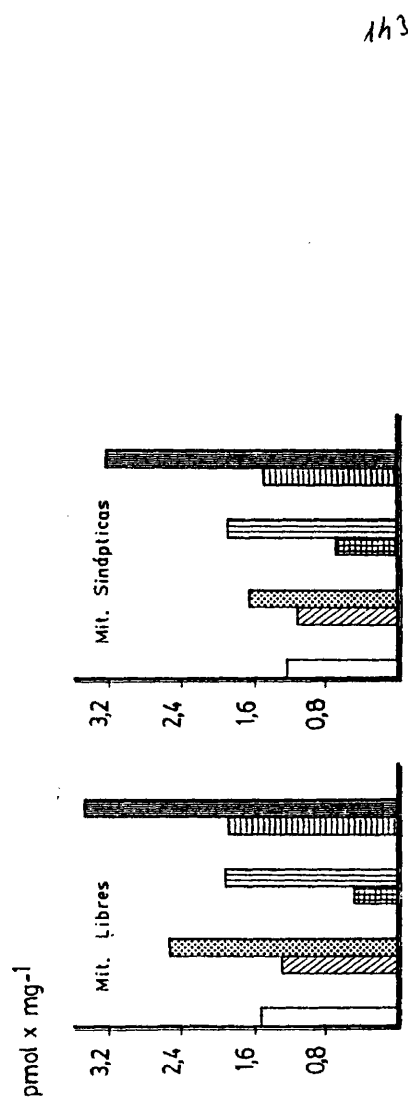


Fig. 12.- EFECTO DE LOS SUSTRATOS EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C -LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL. \square Control; ▨ Succinato + ADP; ▩ Piruvato + malato; ▧ Piruvato + malato + ADP; ▦ Glutamato + malato; ▬ Glutamato + malato + ADP.

4.2.2.4.3.- Efecto de la tironina y fenobarbital en la incorporación.

Existen numerosos datos que apoyan una relación entre hormona tiroidea y distintos aspectos mitocondriales, así Roodyn y col. (1965) apuntaron la estimulación por efecto de tironina sobre la biosíntesis proteica mitocondrial en preparaciones de mitocondrias aisladas de hígado. También se ha publicado recientemente por Roth-Schechter y col. (1979) un aumento en la biosíntesis proteica mitocondrial en células gliales tras la administración de pentobarbital. Por ello nos planteamos qué efecto tendrían estos dos agentes, tironina y fenobarbital sobre la biosíntesis proteica mitocondrial en nuestras preparaciones, en la Tabla XXXVI se reflejan los resultados obtenidos, habiendo encontrado con las dos sustancias y en las dos fracciones un efecto inhibitorio.

Como sistema de incubación se ha utilizado glutamato + malato + ADP. También se estudió el efecto del ión Mg^{2+} y del dinitrofenol, resultando la eliminación del Mg^{2+} del medio de incubación en una potente inhibición que alcanzó el 63,1 % y 77,4 % para mitocondria libre y sináptica respectivamente. A su vez el DNP inhibió ampliamente la incorporación en ambas fracciones.

TABLA XXXVI

EFFECTO DEL DNP, Mg^{2+} , TIRONINA Y FENOBARBITAL EN LA INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL.

	Mitocondria libre	Mitocondria sináptica
Control	4,155 (-----)	3,189 (-----)
DNP 0,2 mM	1,697 (59,1)	0,622 (80,4)
Medio sin Mg^{2+}	1,533 (63,1)	0,720 (77,4)
Liotironina 3,34 $\mu g/mg$	2,703 (34,9)	2,662 (16,5)
Fenobarbital 200 $\mu g/mg$	2,149 (48,2)	1,710 (46,3)

Los resultados estan expresados en pmol/mg/30 minutos. El medio contenía glutamato + malato + ADP. Entre paréntesis se representa el porcentaje de inhibición respecto al control.

4.2.2.4.4.- Experimentos en ratas tiroidectomizadas

Se utilizaron ratas tiroidectomizadas a los 13 días de vida y sacrificadas a los 18 días. La obtención de mitocondrias libres y sinápticas se efectuó por gradientes discontinuos de Ficoll al 7,5 y 10 %. Una vez obtenidas las dos fracciones mitocondriales se caracterizaron enzimáticamente y se estudió su capacidad de incorporación de leucina.

a) Actividades enzimáticas

No se han encontrado diferencias notables entre mitocondrias libres y sinápticas en ratas controles y tiroidectomizadas (Tabla XXXVII). De los valores de los enzimas mitocondriales no obstante, se puede sugerir una ligera disminución de la actividad citocromo c oxidasa en ratas tiroidectomizadas.

b) Incorporación de ^{14}C leucina

La incorporación se ha efectuado en medio de respiración 100 mM K^+ con fuente exógena de ATP. Entre ratas controles y tiroidectomizadas hay un ligero aumento en la incorporación en ratas tiroidectomizadas.

La incorporación en mitocondrias libres es superior a la encontrada en ratas adultas en un 7 % mientras que en mitocondria sináptica se ha encontrado una disminución del 50,4 % (Tabla XXXVIII).

TABLA XXXVII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL EN RATAS CONTROLES Y TIROIDECTOMIZADAS DE 18 DIAS DE VIDA.

	Mitocondria libre		Mitocondria sináptica	
	Control	Tiroidec.	Control	Tiroidectom.
Lactato deshidrogenasa	40	41	40	51
Lactato deshidrogenasa + Triton	99	100	290	319
Acetil colineste.	27	30	43	33
Succinato deshidrogenasa	14,8	14,9	8,9	8,99
Citocromo c oxidasa	420	366	350	333
Citrato sintasa	713	773	621	592

Los datos estan expresados en nmol/min/mg.

TABLA XXXVIII

INCORPORACION "IN VITRO" DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL EN RATAS CONTROLES Y TIROIDECTOMIZADAS DE 18 DIAS DE VIDA.

	Mitocondrias libres	Mitocondria sináptica
Control	1,622	0,606
Tiroidectomizada	1,716	0,724

Los datos estan expresados en pmol/mg/30 minutos.

4.2.3.- Mitocondrias aisladas por bifase

De los resultados enzimáticos encontrados en las fracciones mitocondriales aisladas por el empleo de gradientes discontinuos de sacarosa o Ficoll, se pone de manifiesto la persistencia en las mismas de lactato deshidrogenasa y acetil colinesterasa, lo que implica la existencia de ciertos contaminantes en dichas fracciones mitocondriales. No obstante, los valores de estas enzimas marcadores de sinaptosomas descritos en esta memoria, son inferiores a la mayoría de los resultados descritos hasta ahora para fracciones de mitocondrias aisladas por centrifugación, por lo que parecía que las técnicas actuales de centrifugación podían estar limitadas para lograr una mayor purificación. De aquí, que se planteara el recurrir al empleo de otros métodos que permitiesen aislar partículas con un alto grado de pureza.

Debido a que la membrana del sinaptosoma difiere en composición de la membrana mitocondrial y dado que los sistemas bifásicos de polímeros de alto peso molecular son susceptibles de separar partículas en función de las propiedades de sus membranas, se planteó si estos sistemas bifásicos podrían servir para la separación de mitocondrias de sinaptosomas. A su vez en esta técnica no se emplean altas fuerzas centrífugas por lo que en principio resultaba ser una técnica idónea para la separación de nuestras partículas, diseñando una serie de experimentos para lograr las condiciones adecuadas para la separación de mitocondrias de sinaptosomas en condiciones de máxima pureza.

Otro aspecto que se planteó, fue el estudiar como se comportarían las mitocondrias purificadas en la incorporación "in vitro" de aminoácidos, ó lo que es lo mismo comprobar el grado de interferencia de la contaminación sobre la cuantificación de la capacidad biosintética de la mitocondria.

4.2.3.1.- Utilidad de los sistemas bifásicos para el aislamiento de mitocondrias y sinaptosomas.

4.2.3.1.1.- Determinaciones enzimáticas

La caracterización de la fracción mitocondrial, se ha llevado a cabo evaluando las actividades de los enzimas marcadores de sinaptosomas y de mitocondrias. En la Tabla XXXIX, se describen estos valores a lo largo del fraccionamiento, destacándose, la baja contribución de los enzimas lactato deshidrogenasa y acetil colinesterasa en mitocondria purificada por bifase, ya que representan el 0,018 % de la actividad total para LDH en presencia de Triton X-100 y el 0,009 % para acetil colinesterasa. A su vez las actividades enzimáticas específicas para estos enzimas han sido de 20 nmol/min/mg y de 12,5 nmol/min/mg respectivamente (Tabla XL). Un dato a destacar es el efecto del sistema bifásico sobre las actividades enzimáticas de los contaminantes, así la fracción de mitocondrias libres obtenidas tras el paso previo de purificación por la banda de Ficoll al 6 % muestra una actividad enzimática específica para lactato deshidrogenasa de 584 nmol/min/mg y una vez sometida a bifase queda reducida a 20 nmol/min/mg en la presencia de Tritón X-100; en el caso de acetil colinesterasa pasa de 35 nmol/min/mg a 12,5 nmol/min/mg, lo que pone de manifiesto que el sistema bifá

sico posee una gran efectividad para purificar la fracción mitocondrial, ya que no solo reduce las actividades marcadoras de contaminantes, sino que aumenta las actividades de enzimas marcadores mitocondriales pasando la actividad enzimática específica de citrato sintasa de 365 a 679 nmol/min/mg (Tabla XL).

En la Tabla XLI, están reflejados los valores encontrados para diversos enzimas tanto en la fracción de mitocondrias libres como para sinaptosomas purificados por bifase. En la fracción mitocondrial, las actividades enzimáticas específicas para citrato sintasa es de 633 nmol/min/mg, 340 nmol/min/mg para fumarasa y de 320 nmol/min/mg para citocromo c oxidasa, valores que están de acuerdo con los descritos para fracciones de mitocondrias con un buen grado de pureza. La fracción de sinaptosomas posee un valor para lactato deshidrogenasa de 104 nmol/min/mg, experimentando un fuerte incremento por la adición de Tritón X-100, alcanzando un valor de 695 nmol/min/mg, valores que juntamente con el de 62,1 nmol/min/mg para acetil colinesterasa caracterizan a esta fracción como sinaptosomal (Booth y Clark, 1978), a su vez los valores de fumarasa, citrato sintasa y citocromo c oxidasa están de acuerdo con los descritos por Booth y Clark (1978) y Lai y Clark (1977).

4.2.3.1.2.- Ensayos respiratorios

Identificada la fracción mitocondrial se procedió a la determinación de la capacidad respiratoria frente a diversos sustratos oxidables, determinándose el RCR y el cociente P:O. Los valores encontrados para el RCR, son índices de un buen acoplamiento por efecto de la adición de ADP, a su vez la

fosforilación oxidativa viene reflejada por el cociente P:O, siendo de 2,4 a 2,8 para glutamato y piruvato en presencia de malato y de 1,8 para succinato (Tabla XLII).

También se ha estudiado el efecto de las altas concentraciones de potasio en el medio de incubación (Tabla XLII), de los valores encontrados, tanto en la presencia de succinato como en la de glutamato más malato se ha apreciado un ligero es estímulo en los valores de los RCR, sin embargo este efecto no se pone de manifiesto en la presencia de piruvato más malato, donde ha aparecido una disminución en dicho valor.

TABLA XXXIX

ACTIVIDADES ENZIMATICAS A LO LARGO DEL PROCESO DE BIFASE.

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintetasa	Proteinas
Homogenado	1626,15	1626,15	210,71	453,25	2266,20
Núcleo	218,37	529,10	78,87	152,29	897,25
Crudo mitocon- drial	24,68	101,46	37,91	119,47	387,50
Sobrenadante	561,16	712,08	93,45	70,41	882,00
Sinaptosoma Ficoll 6 %	12,78	73,18	10,10	29,09	138,18
Sinaptosomas bifase	1,92	12,81	1,14	5,66	18,42
Mitocondria Ficoll 6 %	10,89	40,81	2,47	25,52	69,82
Mitocondria bifase	0,20	0,30	0,02	3,91	12,09

Las actividades enzimáticas están expresadas en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{fracción}$. Las proteínas están expresadas en $\text{mg}/\text{fracción}$.

15h

TABLA XL

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS A LO LARGO DEL PROCESO DE BIFASE.

	LDH	LDH + Triton	Acetil colin.	Citrato sintetasa
Homogenado	717,00	717,00	92,90	200,00
Núcleo	243,00	589,00	87,90	169,00
Crudo mitocon- drial	63,70	261,00	97,80	308,00
Sobrenadante	636,00	807,00	105,00	79,80
Sináptosomas Ficoll 6 %	92,50	529,00	73,10	21,00
Sináptosomas bifase	104,00	695,00	62,10	307,00
Mitocondria Ficoll 6 %	156,00	584,00	35,00	365,00
Mitocondria bifase	5,00	20,00	12,50	679,00

Las actividades están expresadas en nmol/min/mg.

TABLA XLI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS DE MITOCONDRIAS Y SINAPTOSOMAS AISLADOS POR BIFASE.

	Mitocondrias	Sinaptosomas
Lactato deshidrogenasa	0,005 (6)	0,104 (2)
Lactato deshidrogenasa en presencia de Tritón	0,014 (4)	0,695 (2)
Acetil colinesterasa	0,010 (6)	0,061 (2)
Citrato sintasa	0,633 (2)	0,309 (1)
Fumarasa	0,340 (3)	0,068 (3)
Citocromo c oxidasa	0,320 (3)	0,042 (3)

Las actividades enzimáticas estan expresadas en $\mu\text{mol/min/mg.}$

TABLA XLII

PARAMETROS RESPIRATORIOS DE MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS POR BI
FASE.

	KCL	ADP:O	RCR	Estado III
Piruvato 5 mM +	5 mM	3	5,3	94
malato 2,5 mM	100 mM	2,8	3	70
Succinato 10 mM	5 mM	1,5	2,6	106
	100 mM	1,8	3,4	118
Glutamato 5 mM +	5 mM	2,4	3,0	70
malato 2,5 mM	100 mM	2,4	3,4	59

Los resultados estan expresados en n atomos O_2 /min/
mg.

4.2.3.1.3.- Microscopía Electrónica

Se han realizado ensayos de microscopía electrónica con las fracciones correspondientes a crudo mitocondrial , mitocondrias libres y a sinaptosomas.

La fotografía I, corresponde a crudo mitocondrial, en ella se aprecia como aparecen fundamentalmente dos tipos de orgánulos perfectamente diferenciados, mitocondrias libres y sinaptosomas, junto a una amplia gama de membranas.

En la fotografía II, se presenta una sección correspondiente a mitocondrias libres purificadas por bifase. Hay que destacar dos aspectos fundamentalmente: por una parte la alta integridad de la mayoría de las mitocondrias, pudiendo apreciar la membrana interna y externa así como la matriz mitocondrial y por otro lado la ausencia total de sinaptosomas en esta fracción, pudiendo observarse algún resto de membrana, pero con muy baja significación. También se aprecia una heterogeneidad morfológica diferenciándose dos tipos de mitocondrias, unas de gran tamaño y otras de tamaño inferior.

En la fotografía III, aparece una sección de sinaptosomas purificados por bifase. Se destaca la ausencia total de mitocondrias libres en la preparación, así como una perfecta integridad de los sinaptosomas, pudiendo distinguirse como la membrana plasmática se mantiene continua y alberga en su interior a las vesículas juntamente con las mitocondrias sinápticas. A su vez se puede distinguir la presencia de membranas postsinápticas apreciándose algunas perfectamente acopladas al si-

naptosoma formando el complejo sináptico completo. También se observa, una variación en el tamaño de diferentes poblaciones de sinaptosomas.

159

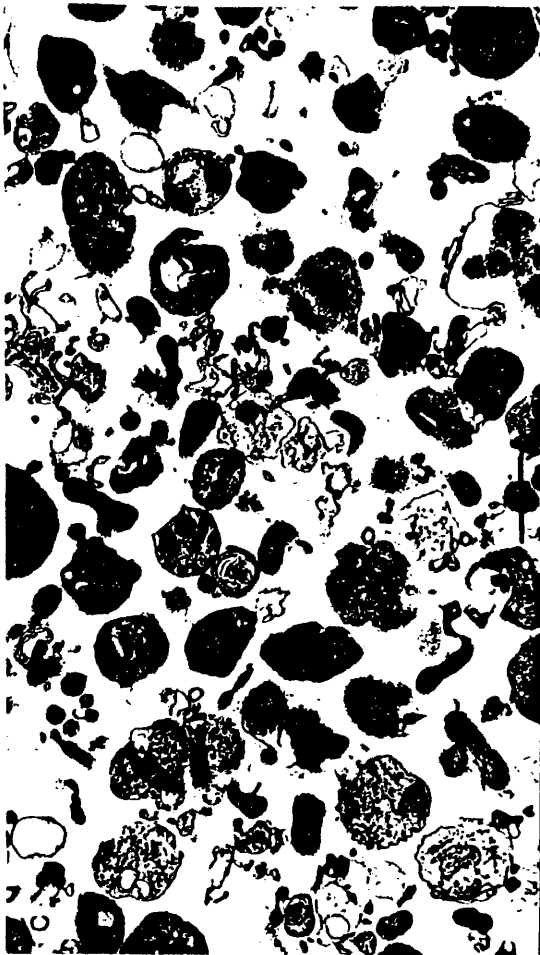


Fotografia 1.- CRUDO MITOCONDRIAL A 15.000 AUMENTOS.

160



Fotografía 2.- MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS POR BIFASE
A 15.000 AUMENTOS.



Fotografía 3.- SINAPTOSOMAS AISLADOS POR BIFASE
A 15.000 AUMENTOS.

4.2.3.2.- Mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll y posterior purificación por bifase.

4.2.3.2.1.- Determinaciones enzimáticas

En estos experimentos se han empleado ratas de 18 días de vida, ya que el resto de los experimentos se han realizado con ratas adultas, se ha pretendido obtener información acerca de las posibles variaciones existentes en estos dos estadios.

En la Tabla XLIII se describen las actividades enzimáticas de las mitocondrias libres y sinápticas obtenidas por gradiente discontinuo de Ficoll y posterior purificación por sistemas bifásicos. Es importante destacar la disminución de lactato deshidrogenasa en las fracciones purificadas por bifase, pasando de 99 a 30 nmol/min/mg en mitocondria libre y de 290 a 80 nmol/min/mg en mitocondria sináptica. A su vez en la fracción de mitocondria sináptica ha habido una importante reducción en la actividad acetil colinesterasa, demostrando la alta eficacia del sistema bifásico en la purificación de fracciones mitocondriales.

Comparando estos resultados con los encontrados en periodo adulto, en la fracción de mitocondrias libres no se han encontrado diferencias significativas en los dos periodos estudiados, no obstante en mitocondrias sinápticas ha aparecido una disminución importante en las actividades citrato sintasa y citocromo c oxidasa.

TABLA XLIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS
POR GRADIENTE DISCONTINUO DE FICOLL Y POSTERIOR PURIFICACION
POR BIFASE.

	Mitocondrias libres		Mitocondria sináptica	
	Ficoll	Bifase	Ficoll	Bifase
Lactato deshidrogenasa	40,00	11,00	40,00	17,00
Lactato deshidrogenasa + Tritón	99,00	30,00	290,00	80,00
Acetil colinesterasa	27,00	24,00	43,00	23,00
Citocromo c oxidasa	420,00	445,50	350,00	330,00
Citrato sintasa	713,00	721,00	621,00	442,00
Succinato deshidrogenasa	15,00	---	9,00	---

Los resultados estan expresados en nmól/min/mg.

--- No determinada por interferencia de la bifase con la técnica de determinación enzimática.

4.2.3.2.2.- Incorporación de ^{14}C leucina

El medio de incubación empleado ha sido el medio 100 mM potasio, con fuente exógena de producción de energía, para poder comparar estos resultados con los obtenidos en periodo adulto. La incorporación encontrada ha sido 1,71 pmol/30 min/mg para mitocondrias libres, lo que supone frente a 1,517 pmol/ 30 min/mg del periodo adulto un incremento del 12,7 %. En mitocondrias sinápticas se ha obtenido un valor de 0,874 pmol/30 min / mg, que contrasta con el 1,222 pmol/30 min/mg en estado adulto, representando una reducción del 28,4 %.

A su vez otro aspecto ha destacar es la comparación de los resultados encontrados en las mitocondrias obtenidas por Ficoll sin purificar por bifase con éstas, (Tabla XLIV) apareciendo tanto en mitocondrias libres como en sinápticas un incremento del 5,4 % y del 44,2 % respectivamente, lo que significa un claro aumento en la incorporación de aminoácidos por las fracciones purificadas por bifase.

TABLA XLIV

INCORPORACION DE ^{14}C LEUCINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS POR GRADIENTES DISCONTINUOS DE FICOLL Y POSTERIOR PURIFICACION POR BI FASE.

	Ficoll	Bifase
Mitocondria libres	1,622	1,710
Mitocondria sináptica	0,606	0,874

Los resultados estan expresados en pmol/30 min/
mg.

166

5.- DISCUSSION

5.- DISCUSION

5.1.- Experiencias "in vivo"

5.1.1.- Utilidad de los gradientes discontinuos de sacarosa para la separación de mitocondrias libres y sinápticas

Desde los trabajos originales de Whittaker(1960) y Gray y Whittaker (1960, 1962) el empleo de gradientes discontinuos de sacarosa para la separación de orgánulos de homogenados de cerebro ha tenido una gran difusión, siendo actualmente una de las técnicas comunmente utilizadas para la separación de mitocondrias libres y sinaptosomas y posterior fraccionamiento de sinaptosomas en sus distintos componentes, como vesículas y mitocondrias sinápticas (Gfeller y col., 1971; Gayet y Durand , 1977; Dienel y col., 1977; Bradford, 1969; Blokhuis y Veldstra, 1970; Sperk y Baldessarini, 1977). El planteamiento de nuestro trabajo era el estudio de la biosíntesis proteica en mitocondrias de cerebro de rata, siendo el primer objetivo del mismo disponer de las dos fracciones de mitocondrias, libres y sinápticas, y dado que los gradientes discontinuos proporcionan una técnica adecuada y segura para la separación de ambas poblaciones mitocondriales se recurrió al empleo de los mismos.

5.1.1.1.- Estudio enzimático en el fraccionamiento por gradiente discontinuo de sacarosa

Las actividades enzimáticas específicas de lactato deshidrogenasa (marcador citoplásmico) más bajas corresponden a las fracciones de mitocondrias libres y sinápticas presen

tándose asimismo el menor estímulo en dicha actividad por efecto del Tritón X-100, deduciendo que las fracciones mitocondriales son las más puras del proceso de separación. La actividad específica acetil colinesterásica posee a su vez muy baja significación, lo que supone escasa contaminación con membranas. Los valores de los enzimas mitocondriales, citocromo c oxidasa y citrato sintasa presentan unos valores semejantes a los descritos por Jones y col. (1975) y Lai y Clark (1976). De la consideración de estos parámetros enzimáticos se deduce que el gradiente discontinuo de sacarosa proporciona dos fracciones perfectamente separadas, que una vez caracterizadas por enzimas marcadores se identifican como mitocondrias libres y sinápticas con un buen grado de purificación.

5.1.1.2.- Caracterización de mitocondrias libres y sinápticas obtenidas por gradientes discontinuos de sacarosa

a) Actividad respiratoria

Una de las propiedades que caracterizan una preparación mitocondrial es su capacidad respiratoria frente a sus tratos oxidables; hay que considerar que las altas concentraciones de sacarosa utilizadas en los gradientes originan una alta hiperosmoticidad que provoca una deshidratación de la mitocondria causando alteraciones estructurales (Beaufay y Berthet, 1963; Beaufay y col., 1964; De Duve, 1971; Lusena, 1965; Lusena y Depocas, 1966; Wattiaux y col., 1971) que pueden alterar la fosforilación oxidativa con pérdida del control respiratorio (Whittaker, 1969a; Diminio y Hoch, 1972). No obstante, Pickett y col. (1977) han descrito el efecto beneficioso originado por

el tratamiento de las fracciones mitocondriales con seroalbúmina exenta de ácidos grasos, ya que ésta ejerce un efecto de protección y recuperación de la membrana mitocondrial juntamente con la eliminación de los ácidos grasos del medio, que poseen un efecto desacoplante como comprobó Borst y col. (1962), recuperando la actividad respiratoria.

Las mitocondrias obtenidas por sacarosa y tratadas con seroalbúmina utilizaron diferentes sustratos con RCR de 2, que supone una discreta capacidad respiratoria. También se ha observado un estímulo en la respiración por efecto de las altas concentraciones de potasio en el medio de incubación, propiedad característica de la mitocondria de cerebro, según se ha descrito por Ozawa y col. (1967), y Clark y Nicklas (1970).

b) Espectro de citocromos

Otra propiedad de la mitocondria es su alto contenido en citocromos, los perfiles encontrados en mitocondrias libres y sinápticas no han mostrado diferencias cualitativas, no obstante en su cuantificación aparecen unos valores ligeramente superiores en la fracción sináptica, siendo significativo este aumento en citocromo b.

c) Determinación de RNA y DNA

Los datos obtenidos para RNA están de acuerdo con los descritos por Larry y col. (1975), sugiriendo un mayor contenido en mitocondrias libres, también se ha encontrado estos resultados para DNA.

d) Contaminación microsómica

Dada la importancia que tiene en los estudios de biosíntesis proteica mitocondrial la posible contaminación de las fracciones mitocondriales por microsomas, se realizó un estudio de la radioactividad a lo largo de todo el fraccionamiento (Tabla VIII). En el sobrenadante postmitocondrial apareció una radioactividad específica de 594 cpm/mg, el crudo mitocondrial se lavó con medio de aislamiento y una vez centrifugado el sobrenadante de este primer lavado tenía una radioactividad de 780 cpm/mg, el crudo resultante se lavó dos veces más obteniéndose en los sobrenadantes una radioactividad de 222 cpm/mg y 128 cpm/mg, siendo la radioactividad específica más baja de todas las fracciones estudiadas, lo que supone una eliminación progresiva de microsomas de la fracción de crudo mitocondrial en los lavados sucesivos del mismo. A su vez no se ha detectado actividad NADPH citocromo c oxidoreductasa (marcador de microsomas) en ninguna de las dos fracciones objeto de estudio, mitocondria libre y sináptica. Por último hay que considerar los resultados descritos por Whittaker (1969 a), quien caracterizó e identificó a la fracción de microsomas en el gradiente a concentraciones de sacarosa 0,4 - 0,6 M y las fracciones de mitocondrias se obtienen a concentraciones de sacarosa superiores a 1, 2 M, por lo que resulta improbable la presencia de microsomas en nuestras fracciones.

Del conjunto de parámetros estudiados se deduce que el gradiente discontinuo de sacarosa proporciona dos fracciones de mitocondrias bien separadas con ligera contaminación citoplásmica, escasa contaminación con membranas, no detectable

contaminación microsómica y una discreta capacidad funcional.

5.1.2.- Incorporación de ^3H -L-Leucina

5.1.2.1.- Estudios en cortes de cerebro

Una vez incubados los cortes de cerebro en presencia de leucina tritiada, se separaron las dos fracciones mitocondriales, midiendo la radioactividad incorporada en cada una de las mismas. De los resultados obtenidos se sugiere una mayor capacidad biosintética en mitocondrias libres frente a mitocondrias sinápticas, con las reservas impuestas por la alta desviación numérica encontrada. La incorporación ha sido resistente a cicloheximida y sensible a cloranfenicol, lo que determina una auténtica biosíntesis proteica mitocondrial y excluye el aporte de radioactividad por biosíntesis proteica citoplásmica. Los valores de radioactividad específica han sido 0,0339 pmol/mg/h para mitocondria libre y 0,0198 pmol/mg/h para mitocondria sináptica mostrándose inferiores a los descritos por otros autores en estudios de biosíntesis proteica mitocondrial. No obstante Dunlop y col. (1974), Jones y Banks (1970), Jones y McIlwain (1971) apuntaron la obtención de bajos valores en experimentos en cortes de tejidos frente a trabajos realizados "in vivo". A su vez hay que considerar que en los cortes de tejidos se encuentra gran cantidad de elementos estructurales dañados y alterados (Cohen y Hartmann, 1964; Ibata y col., 1971; Torack y col., 1965; Wanko y Tower, 1964), por ello se sustituyó el estudio en preparaciones en cortes de cerebro por experimentos "in vivo", quedando descartada toda duda acerca de la integridad y funcionalidad del tejido.

5.1.2.2.- Incorporación "in vivo" de ^3H -Leucina

El estudio de la biosíntesis proteica mitocondrial en experimentos "in vivo" tiene las ventajas de resolver el problema de la integridad de los cortes de tejido, eliminar la posible contribución por contaminación bacteriana durante la incubación, carecer de importancia el grado de funcionalidad de las fracciones mitocondriales y aproximarse a la realidad biológica más que en los experimentos "in vitro".

Se han realizado numerosos trabajos de biosíntesis proteica en cerebro, tras la observación de Ritcher (1965), afirmando que la actividad biosintética en cerebro era comparable a otros órganos, aunque el recambio en dicho tejido se considera un 30 % del encontrado en hígado (Schapiro y col., 1960). De las distintas fracciones aisladas de homogenados de cerebro han despertado gran interés las fracciones mitocondriales tras la observación de la capacidad de dicho orgánulo para incorporar aminoácidos marcados y así Khan y Wilson (1965), Beattie y col., (1967 a), Hungen y col., (1968), Rodríguez de Lores y col. (1971), Tunri Ari y Piha Sakari (1975) han estudiado la vida media de la mitocondria tras la administración de leucina marcada. Para este objetivo se han realizado pulsos durante periodos de tiempo que comprenden días e incluso semanas, no habiéndose determinado la evolución a intervalos más cortos de tiempo.

Entre las posibles vías de administración del isótopo se ha seleccionado la inyección intraventricular ya que ofrece las ventajas de salvar la barrera hematoencefálica, alcanzar localmente una alta actividad específica y reducir los

fenómenos de reutilización (Rodríguez de Lores y col., 1971 ; Hungen y col., 1968). A su vez se ha comprobado como la leucina marcada se recoge fundamentalmente en proteínas, siendo la cantidad de metabolitos muy pequeña (Roberts y Morelos, 1965).

Los resultados encontrados en las dos fracciones mitocondriales sugieren la siguiente evolución: tras la administración de leucina marcada, ésta difundirá por todo el tejido cerebral y parte alcanzará la neurona. A un corto periodo de tiempo (3 horas) las dos fracciones mitocondriales incorporaran el isótopo en su propia proteína (Fig. 13). Posteriormente, el material no marcado que se encontraba en el axon durante la administración de leucina tritiada, llegará a la terminación nerviosa por transporte axoplásmico, lo que originará una dilución isotópica en dicha fracción y una disminución de la radioactividad que se hace mínima a las 13,3 horas (fig. 13). Mientras tanto en el cuerpo de la neurona continua la incorporación del isótopo apareciendo un alto marcaje en la fracción de mitocondrias libres que alcanza el valor máximo a las 13,3 horas (figura 13).

El segundo pico de radioactividad que aparece en las mitocondrias sinápticas a las 22 horas debe ser ocasionado por la llegada de material marcado en el cuerpo de la neurona durante las 13,3 primeras horas y no por síntesis "de novo" en este periodo de tiempo. A esta conclusión se puede llegar, observando por un lado que el sistema no está saturado, como se demuestra de la administración de isótopo de diferente actividad (Tabla X), y por otro, la rápida caída de radioactividad en las mitocondrias libres, que aparece a partir de las 13,3 horas. Ambos hechos sugieren claramente la efectividad del pulso, de

17h

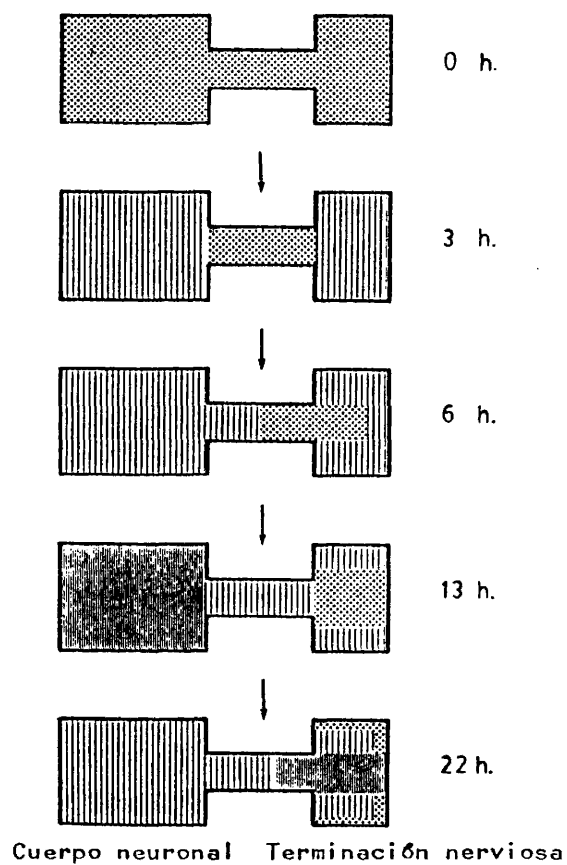


Fig. 13.- ESQUEMA DE LA INTERPRETACION PROPUESTA PARA LOS EXPERIMENTOS "IN VIVO".

▣ Material no marcado; ▤ Material marcado; ▥ Material fuertemente marcado.

tal manera que a partir de las primeras horas debe esperarse que todo el isótopo ha sido utilizado y/o difundido a todo el flujo cerebroespinal.

Estos resultados son semejantes a los descritos por Gurd (1978), quien encontró en la fracción sinaptosomal dos máximos, en la incorporación de leucina tritiada a las cuatro y dieciséis horas, tras su administración por vía intracraneal. A su vez Hungen y col. (1968) encontraron a las cuatro horas de pulso una incorporación de 600 cpm/mg y 300 cpm/mg para mitocondria libre y sináptica respectivamente, que apoyan la distinta incorporación encontrada en ambas fracciones mitocondriales a corto período de tiempo. También hay que descartar la posible contribución de microsomas en nuestras fracciones como se discutió anteriormente.

5.1.2.3.- Experimentos de pulso-caza

Para confirmar nuestra Hipótesis del transporte de la mitocondria marcada del cuerpo celular a la terminación nerviosa, se plantearon experimentos de pulso-caza. De ellos se desprende que se ha producido un descenso importante en la incorporación en mitocondrias libres y poco significativo en la fracción de mitocondrias sinápticas, sugiriendo una mayor respuesta en mitocondria libre por efecto de la dilución con leucina fría, lo que apoyaría nuestra hipótesis. No obstante hay que considerar, que la parada en la incorporación tras la administración de leucina fría por vía intraperitoneal, no es total ya que la inhibición encontrada a las 22 horas de pulso fue del 68,6 % y del 58,5 % en mitocondria libre y sináptica respectiva

mente, cuando se administró una hora antes de la leucina tritiada, pudiendo deberse este comportamiento al grado de biodisponibilidad y accesibilidad de la leucina fría al cerebro.

La confirmación de nuestra hipótesis se obtuvo, por el empleo de un inhibidor del transporte axoplásmico, colchicina, ya que tras su administración se encontró una inhibición en mitocondria libre del 20,9 % frente a un 31 % en mitocondria sináptica, explicándose este mayor descenso en la incorporación de la fracción de mitocondrias sinápticas por una interrupción del transporte de mitocondria marcada a la terminación nerviosa.

5.1.2.4.- Efecto de la cicloheximida y cloranfenicol en la biosíntesis proteica mitocondrial

a) Administración intraperitoneal

Ambos antibióticos pasan la barrera hematorraquídea, siendo susceptibles de ejercer su acción a nivel cerebral (Siegel y col., 1976). La administración se realizó una hora antes de la de leucina tritiada, para eliminar el efecto descrito por Ch'In y col. (1976) de recuperación y estímulo de la biosíntesis proteica, por efecto de la cicloheximida, cuando transcurran largos periodos desde su administración. La inhibición causada por el cloranfenicol ha sido del 14,6 % y 11,3 % en mitocondria libre y sináptica respectivamente. Este ligera inhibición estaría de acuerdo con las observaciones de Ashwell y Work (1970), Borst (1972), Schatz (1970), Avadhani y col. (1974), Schatz y Mason (1974) acerca de la contribución de la biosínte-

sis proteica mitocondrial, que representa del 8 - 10 % de sus proteínas, explicando la ligera inhibición encontrada tras la administración de cloranfenicol. La cicloheximida causó una inhibición del 75 % y 70,6 % de mitocondria libre y sináptica respectivamente. Ch'In y col. (1977) observaron fuertes inhibiciones en la biosíntesis proteica en distintas fracciones de hígado y riñón, alcanzando dicho efecto también a la fracción mitocondrial (Ch'In y col., 1978). A su vez Satav y col. (1977), encontraron una inhibición en la biosíntesis proteica mitocondrial en hígado del 85 % y del 96,1 % a una y dos horas después de la administración de cicloheximida, valores semejantes a los obtenidos en nuestras fracciones. Las dosis empleadas han sido de 4 mg/Kg de peso no pudiendo explicar los resultados obtenidos por un efecto tóxico del antibiótico, ya que estos aparecen a dosis de 10 - 100 mg/Kg de peso (Maramatsu y col., 1970; Ch'In y col., 1976; Daska y col., 1975).

b) Administración intracerebroventricular

El cloranfenicol provocó unas inhibiciones del 74 % y del 91,5 % en mitocondrias libres y sinápticas. Estos valores se podrían explicar por el efecto del cloranfenicol no solo a nivel de biosíntesis proteica sino también al síndrome provocado tras su administración intraventricular que originó, ataxia y locura y que culminó con la muerte de los animales a dosis de 5,7 mg/300 g de peso. Cuando la dosis se redujo a 2,85 mg/300 g de peso, apareció el síndrome, no sobreviniendo la muerte, no obstante ante el estado de los animales se consideró aconsejable sacrificarles a los 20 minutos. Ramírez (1973) y Dunn (1971) apuntaron que estas acciones se deberían no solo a la in

hibición de la biosíntesis proteica mitocondrial sino también a alteraciones causadas a nivel del complejo sináptico, lo que explificaría el síndrome producido por el cloranfenicol.

La inhibición causada por cicloheximida fue para mitocondrias libres del 62 % y del 77,6 % para mitocondrias sinápticas. Estos valores son ligeramente inferiores a los obtenidos tras la administración intraperitoneal. No obstante, hay que considerar, que el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración del antibiótico y la leucina tritiada ha sido muy corto y ya apuntó Satav y col. (1977) que en hígado y tras administración intraperitoneal se requería al menos 40 minutos para observar inhibición en la biosíntesis proteica mitocondrial, A su vez hay que tener en cuenta la existencia de una fracción de la biosíntesis proteica mitocondrial que no depende de la citoplásmica, siendo por lo tanto resistente a cicloheximida.

La inhibición por efecto de la cicloheximida no se puede demostrar por una acción directa sobre la mitocondria, ya que no interfiere ni con el metabolismo energético, ni con la reserva de aminoácidos. A su vez, tampoco se ha observado acción por sus metabolitos (Satav y col., 1977). De lo anteriormente expuesto se deduce una vez más la interdependencia de los dos sistemas biosintéticos, citoplásmico y mitocondrial, durante la biogénesis de la mitocondria (Schatz y Mason, 1974).

5.2.- Estudios de incorporación "in vitro"

La biosíntesis proteica mitocondrial requiere además del aporte necesario de energía, una integridad estructural y funcional, así Rabinovitz y col. (1977) comprobaron como la biosíntesis proteica era dependiente de la integridad de la membrana. En las secciones anteriores se ha discutido como las preparaciones mitocondriales obtenidas por gradientes discontinuos de sacarosa, poseen una discreta capacidad respiratoria, y dada la relación existente entre respiración y estado funcional se recurrió al empleo de gradientes isotónicos de polímeros de alto peso molecular, evitando de esta manera el efecto de las altas concentraciones de sacarosa, sobre las mitocondrias.

5.2.1.- Utilidad de los gradientes de Ficoll

5.2.1.1.- Mitocondrias "Clark and Nicklas"

Del estudio de enzimas marcadores se deduce un bajo contenido en lactato deshidrogenasa y acetil colinesterasa junto con una actividad enzimática específica elevada en citrato sintetasa, que nos permite identificar a esta fracción como mitocondrial. Dada la alta funcionalidad descrita para esta fracción (Clark y Nicklas, 1970), se estudió su capacidad para incorporar aminoácidos marcados. El medio de incubación empleado correspondió al medio de respiración 100 mM K^+ , ya que en este se obtienen los valores respiratorios más elevados (Clark y Nicklas, 1970). La incorporación encontrada ha sido de $0,757 \pm 0,01$ (3) pmol/mg/h., manteniendo un comportamiento lineal durante los primeros 45 minutos, gran sensibilidad a cloranfeni-

col y resistencia a cicloheximida. Grandes discrepancias han existido a cerca de la sensibilidad de las mitocondrias de cerebro a los antibióticos, así Gordon y Deanin (1968), describen una resistencia al cloranfenicol y fuerte sensibilidad a acetoxicicloheximida, postulando que la síntesis proteica en mitocondria de cerebro era cualitativamente distinta de la descrita en mitocondrias de otros órganos, esta hipótesis fue sostenida por Yellin y col. (1967), Cunningham y Bridgers (1970), Haldar (1970). Posteriormente Morgan (1970), demostró que las propiedades mencionadas se debían a un problema de contaminación, pues identificó en las preparaciones mitocondriales juntamente con mitocondrias, sinaptosomas y una serie de estructuras, que poseían en su interior ribosomas estando recubiertas por membranas, siendo éstas sensibles a cicloheximida (Austin y col., 1970). El origen de estas partículas con ribosomas recubiertos con sistemas de membranas ha sido identificado por Johnston y Larramendi (1968) de procedencia glial, o por Tennyson (1970) como partículas procedentes de áxones en crecimiento, estableciéndose definitivamente después de estas observaciones que la mitocondria de cerebro posee las mismas propiedades que las de otros órganos (Bosmann y Hemswork, 1970).

De estos experimentos se deduce que la mitocondria libre Clark y Nicklas incorpora aminoácidos marcados. Sin embargo, el empleo de esta técnica de preparación no logra la separación de mitocondrias libres y sinápticas, sino solamente proporciona la fracción de mitocondrias libres, por lo que fue necesario recurrir al empleo de otros gradientes.

5.2.1.2.- Mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll

Desde la introducción de los gradientes de Ficoll para el aislamiento de distintas partículas de homogenados de cerebro, se han descrito una gran variedad de métodos para la obtención de mitocondrias, como los desarrollados por Kurokawa y col. (1965), Abdel Latif (1966), Autilio y col. (1968), Cotman y col. (1971), Cotman y Matthews (1971), Clark y Nicklas (1970), Lai y Clark (1976), Lai y col. (1977), Booth y Clark (1978), apreciando que pequeñas modificaciones metodológicas llevan consigo grandes variaciones en las fracciones mitocondriales obtenidas. Por ello, se puso a punto una técnica basada en la de Booth y Clark (1978), para separar las dos fracciones de mitocondrias libres y sinápticas.

a) Estudio enzimático en el gradiente discontinuo de Ficoll al 7,5 % y 10 %

En la distribución del lactato deshidrogenasa a lo largo del proceso de separación, no se han encontrado diferencias entre las fracciones obtenidas por Ficoll de las obtenidas por sacarosa, excepto en la fracción de mitocondrias libres, cuya actividad corresponde al 0,13 % de la actividad del homogenado frente al 0,41 % encontrado en sacarosa. Respecto a las actividades enzimáticas específicas se ha logrado una mayor purificación en Ficoll, encontrando unos valores de 43 ± 20 (11) nmol/min/mg para mitocondrias libres y 98 ± 36 (6) nmol/min/mg para mitocondrias sinápticas. En cuanto a la actividad acetilcolinesterasa representa en las dos fracciones mitocondriales de

Ficoll unos valores semejantes a los obtenidos en sacarosa con unas actividades enzimáticas específicas de 20 ± 7 (13) nmol/min/mg para mitocondrias libres (valor coincidente con sacarosa) y 51 ± 22 (6) para mitocondrias sinápticas (valor ligeramente superior a sacarosa). El marcador mitocondrial citrato sintasa posee unas actividades específicas similares en ambas técnicas. No obstante, hay que destacar, un mayor rendimiento en Ficoll obteniéndose para mitocondrias libres el 1,17 % de la proteína total frente al 0,73 % en sacarosa y el 0,3 % en mitocondrias sinápticas de Ficoll comparado al 0,215 % para la misma fracción en sacarosa.

b) Ensayos respiratorios

La capacidad respiratoria mitocondrial frente a distintos sustratos oxidables define el grado de funcionalidad, utilizándose dos parámetros, el RCR y el índice P:O. En presencia de piruvato más malato el RCR ha sido de 4 aproximadamente, para las dos fracciones con un índice P:O de 2,81 en mitocondrias libres y 3,1 en mitocondrias sinápticas. A su vez, en presencia de succinato se han obtenido valores semejantes a los descritos por Lai y Clark (1976). Con glutamato más malato aparecen unas actividades respiratorias inferiores a las descritas presentando no obstante un RCR de 3 aproximadamente.

La adición de magnesio al medio de respiración provocó una caída en los valores respiratorios de las dos fracciones mitocondriales siendo muy significativo con piruvato más malato. En la presencia de succinato este descenso es menor, alcanzando un aumento en el RCR, fenómenos semejantes en presen-

cia del citado ión han sido descritos por Moore y Jöbsis (1970).

Del análisis de los valores obtenidos tanto en enzimas marcadores como en respiración, se deduce que el gradiente discontinuo de Ficoll al 7,5 % y 10 %, proporciona las dos fracciones mitocondriales con un buen grado de pureza, metabólicamente muy activas y altamente acopladas, resultando apropiadas para estudios "in vitro" donde se requiere un alto grado de funcionalidad metabólica.

5.2.1.3.- Incorporación "in vitro" de ^3H -Leucina por mitocondrias libres y sinápticas, aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll

La incorporación de leucina tritiada en las dos fracciones mitocondriales es proporcional al tiempo siendo lineal durante los primeros 45 minutos, obteniéndose a la hora de incubación unos valores de $0,857 \pm 0,1$ (4) pmol/mg, para mitocondria libre y $0,534 \pm 0,2$ (2) pmol/mg para mitocondria sináptica. Estos datos resultan difícil de comparar con los obtenidos por otros autores, ya que como apuntó Beattie (1979) durante mucho tiempo la incorporación se ha expresado en cmp/mg y no en pmol/mg. Este mismo autor, ha apuntado una incorporación de 20 - 60 pmol/mg a concentraciones de leucina de 60 - 80 μM . En nuestras condiciones de experimentación, la concentración utilizada ha sido 0,02 μM es decir de 3000 a 4000 veces menor, obteniéndose una incorporación 23 veces menor. A su vez, hay que considerar que estamos en un sistema no saturado, como se deduce de la correspondencia lineal entre concentración de leucina en el medio de incubación e incorporación, deduciéndose

que nuestra preparación mitocondrial posee una alta capacidad de incorporación. Ramírez y col. (1972) han descrito un valor de 0,224 pmol/mg/h para mitocondrias sinápticas en unas condiciones similares a las nuestras, representando menos del 50 % alcanzado en nuestros resultados. Las dos fracciones mitocondriales, son resistentes a cicloheximida, descartándose la posibilidad de síntesis proteica citoplásmica y muy sensibles al cloranfenicol, caracterizando la incorporación obtenida como biosíntesis proteica mitocondrial.

Comparando los valores de incorporación de mitocondrias libres y sinápticas entre sí, se puede sugerir una mayor actividad biosintética en mitocondrias libres. No obstante, a lo largo de los experimentos realizados, se ha encontrado cierta variabilidad en los resultados, originando amplias desviaciones numéricas que nos llevaron a considerar la posible contaminación bacteriana en nuestra preparación. Ya que el sistema biosintético bacteriano y el mitocondrial poseen propiedades semejantes frente a diversos antibióticos, siendo ambos sensibles al cloranfenicol y resistentes a la cicloheximida (Borst, 1972) cabe la posibilidad de considerar como biosíntesis proteica mitocondrial la debida no sólo a la mitocondrial sino también a la bacteriana cuando existe un grado importante de contaminación en las preparaciones. Sin embargo, ciertos autores (Roodyn y col., 1961; 965; Kalf, 1963; Kroon, 1963) consideran sin importancia la contribución bacteriana en la incorporación. A su vez Bachelard (1966) observó que una contaminación de 400 a 1000 bacterias por ml resulta insignificante en estos estudios. No obstante, Beattie y col. (1967 c) realizaron un estudio detallado comprobando como la mitocondria aislada en condiciones esté-

riles incorporaba aminoácidos y como un número de 10.000 colonias pueden afectar a la incorporación. En los experimentos realizados "in vitro" con leucina tritiada se encontró una contaminación bacteriana comprendida entre 5.000 y 10.000 colonias por ml, siendo un factor que puede contribuir a las desviaciones encontradas, especialmente en la fracción de mitocondrias sinápticas, además de las posibles diferencias existentes entre las mitocondrias obtenidas en las distintas preparaciones.

a) Incorporación de ^3H -Leucina en presencia de sustratos

Dada la funcionalidad encontrada en las preparaciones mitocondriales se substituyó el sistema exógeno de producción de ATP por sistemas endógenos, adicionando al medio de incubación sustratos oxidables. En estado IV la incorporación fué menor en la presencia de sustratos tanto en mitocondrias libres como en sinápticas, alcanzando con glutamato más malato los máximos valores, que en mitocondrias sinápticas fueron superiores a los alcanzados con fuente exógena. En estado III, en presencia de succinato y de piruvato más malato, ha habido un incremento en ambas poblaciones, siendo muy significativo en mitocondria sináptica con succinato y obteniendo un aumento importante en mitocondria libre con piruvato más malato. La substitución de ADP por un "trap" de hexoquinasa en presencia de piruvato más malato produjo un estímulo similar en ambas fracciones. En presencia de atractilosido y glutamato no se apreció variación significativa frente al estado IV.

5.2.1.4.- Incorporación "in vitro" de ^{14}C -L-leucina en mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente discontinuo de Ficoll

En esta serie de experimentos se tuvo un especial cuidado en el control de contaminación trabajando en condiciones de semi esterilidad, a lo largo de todo el proceso. La contaminación nunca fué superior a 1.000 colonias/ml, siendo los valores normales de 100 a 300 colonias/ml, después de haber realizado la incubación. La incorporación se mostró lineal frente al tiempo, alcanzándose unos valores de $1,858 \pm 0,29$ (2) pmol/mg/45 min para mitocondria libre y $1,981 \pm 0,38$ (2) pmol/mg/45 min, para mitocondrias sinápticas. El aumento en la incorporación alcanzada con ^{14}C -Leucina se explicaría por la mayor estabilidad de los isótopos ^{14}C frente a ^3H , eliminando los posibles fenómenos de intercambio. La concentración de leucina ha sido 145 veces superior, que juntamente con la adición de magnesio al medio de incubación, han determinado el aumento en la incorporación específica.

De los experimentos de incorporación frente al tiempo a 37°C , no se pueden deducir diferencias entre las dos fracciones mitocondriales, no obstante de la incorporación realizada a 30°C , juntamente con la media de los valores controles en distintos experimentos de $1,517 \pm 0,26$ (6) pmol/mg/ 30 min, para mitocondrias libres y de $1,222 \pm 0,14$ (6) pmol/ mg/ 30 min, para mitocondrias sinápticas, se sugiere una mayor actividad biosintética en mitocondrias libres frente a mitocondrias sinápticas.

La incorporación ha sido fuertemente inhibida por cloranfenicol en las dos fracciones mitocondriales, no mostrando sensibilidad a cicloheximida. El dinitrofenol, ha causado una fuerte inhibición demostrándose la dependencia estrecha entre integridad funcional y biosíntesis proteica mitocondrial. Porcentajes del 50 % de inhibición con DNP han sido descritos por Larry y col. (1972) en condiciones similares a las nuestras. También se estudió el efecto del magnesio, ya que existen distintos criterios sobre los requerimientos de dicho ión, así Beattie y col. (1979) consideran necesario el aporte externo de magnesio, mientras Larry y col. (1972) opinan que la mitocondria posee unos niveles suficientes para la síntesis proteica. En nuestras preparaciones la eliminación del magnesio del medio produjo una inhibición importante. A la luz de estos resultados se deduce que no es necesaria la adición de magnesio, pero su eliminación produce fuertes inhibiciones.

a) Efecto de la concentración de ^{14}C -Leucina

Existe un comportamiento lineal entre concentración de leucina e incorporación obtenida en las dos fracciones mitocondriales, no obstante a altas concentraciones en mitocondria sináptica se observa una gran incorporación. En las concentraciones habituales de experimentación ($1\mu\text{Ci/ml}$) el comportamiento en ambas fracciones es semejante. De los resultados descritos se deduce que el sistema no se encuentra saturado.

b) Incorporación de ^{14}C -Leucina en presencia de sustratos

La incorporación en presencia de piruvato más

malato y succinato en estado IV es inferior a la obtenida con fuente exógena de ATP, encontrando unos valores semejantes con glutamato más malato. En estado III se ha estimulado la incorporación con todos los sustratos, destacando los altos valores alcanzados con glutamato más malato de 3,4 y 3,2pmol/mg/30 min para mitocondrias libres y sinápticas respectivamente. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en ^3H -Leucina de forma que la presencia de glutamato más malato resulta en una alta incorporación, sugiriendo como posibles causas un aumento en el reservorio de aminoácidos en la mitocondria juntamente con un alto acoplamiento entre el sistema de producción de energía y biosíntesis proteica con dicho sustrato.

c) Efecto de la hormona tiroidea y barbituratos en la incorporación de ^{14}C -Leucina

Una vez seleccionado el sistema de máxima efectividad en la biosíntesis proteica mitocondrial, se estudió el efecto que provocaba sobre la misma el fenobarbital y la triyodotironina. En ambos casos se ha obtenido un efecto inhibitorio. Estos resultados no son concordantes con los de Roodyn y col. (1965) quien no encontró, tras la adición de T_3 a mitocondrias de hígado de ratas normales, variación en la biosíntesis proteica mitocondrial "in vitro", observando un estímulo en dicha síntesis cuando la triyodotironina se administraba "in vivo". La diferencia encontrada puede deberse a la distinta procedencia de las mitocondrias, así como a su distinta obtención y condiciones de incubación.

La disminución de la incorporación en mitocon-

drias tras la adición de fenobarbital podría explicarse en función de las dosis empleadas, 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$, siendo muy alta en relación a los valores de pentobarbital encontrados en cerebros de rata tolerantes, que alcanzaron una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido (Ho y col. 1975). A su vez entre los muchos efectos originados por los barbituratos se citan, la inhibición de la fosforilación oxidativa (Sharpless, 1970) y dado que la biosíntesis proteica mitocondrial es dependiente de aporte energético, al estar inhibida la fosforilación oxidativa quedaría inhibida la síntesis de ATP y por lo tanto la biosíntesis proteica mitocondrial.

También el DNP y la eliminación de magnesio del medio de incubación redujeron notablemente la incorporación. Confirmándose de esta manera que aquellos agentes que modifiquen la fosforilación oxidativa (DNP y barbituratos) modificarán la incorporación y la biosíntesis proteica mitocondrial.

d) Efecto de la tiroidectomía en la incorporación de ^{14}C -Leucina

Otro aspecto estudiado fué que dada la importancia de las hormonas tiroideas durante el desarrollo en animales jóvenes (O'Farrell, 1975; Rall, 1977) y sus implicaciones en el consumo de oxígeno (Lieberman y col., 1979), síntesis de RNA mensajero (Tata, 1966; Gadaleta y col., 1972; Augustine y Hymer, 1978), biosíntesis de determinadas proteínas como seroalbúmina (Lewallen y col., 1959), enzima málico (Oppenheimer y col., 1977) ATPasa sodio-potasio dependiente (Ismail-Beigi y Edelman, 1970) citocromo c (Booth y Hollosky, 1975), y hormona del crecimiento

(Samuels y Shapiro, 1976; Martial y col., 1977), y en la estimulación de las actividades enzimáticas Δ -glicerol fosfato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en hígado, se estudió el efecto de la tiroidectomía sobre la biosíntesis proteica mitocondrial y determinados enzimas mitocondriales.

Se utilizaron ratas tiroidectomizadas quirúrgicamente a los trece días de vida y se sacrificaron a los 18 días. En el estudio de incorporación se utilizó como fuente de energía el sistema exógeno. En los resultados obtenidos aparece un ligero aumento en la incorporación de leucina en ratas tiroidectomizadas tanto en la fracción de mitocondrias libres como en sinápticas, en relación a los controles.

A su vez hay que destacar la incorporación obtenida en mitocondrias sinápticas en ratas controles de 0,606 pmol/mg/30 min, suponiendo un gran descenso tanto frente a mitocondria libre del mismo estadio como en relación con el estado adulto.

De los enzimas estudiados hay que destacar una ligera disminución en la actividad de citocromo c oxidasa en las dos fracciones mitocondriales, que coincidiría con los resultados descritos en hígado por Gavaret y col. (1979).

Del análisis de estos resultados se deduce que la tiroidectomía en la etapa de desarrollo realizada no ha supuesto grandes variaciones ni en la capacidad biosintética mitocondrial ni en las actividades enzimáticas estudiadas.

A su vez hay que considerar que para apreciar va

riaciones significativas en los parámetros estudiados Gavaret y col. (1979) apuntaron la necesidad de tratamientos conjuntos de tiroidectomía y administración de grandes y repetidas dosis de hormona tiroidea.

5.3.- Mitocondrias aisladas por bifase

5.3.1.- Utilidad de los sistemas bifásicos

Los sistemas bifásicos de solventes orgánicos han sido de gran utilidad para separar sustancias de distinta naturaleza en función de sus constantes de reparto. No obstante, el carácter de los componentes de estos sistemas no ha permitido su aplicación a la separación de materiales biológicos, ya que provocaban en los mismos alteraciones estructurales.

El uso de polímeros de alto peso molecular solubles en agua, como el Dextrano T 500 y el polietilenglicol 4000 han permitido solucionar la citada limitación en la aplicación de esta técnica a materiales biológicos.

Cuando se dispone de dos soluciones acuosas de estos polímeros a concentraciones tales que resulten inmiscibles, se formará un sistema bifásico, en el que la fase constituida por el Dextrano presentará un carácter hidrófilo, mientras que la fase formada por polietilenglicol manifestará un carácter hidrófobo. En estas condiciones tras la adición de un material biológico constituido por distintos tipos de partículas, cada clase de partícula se repartirá en una u otra fase en función de la afinidad que presenten por cada una de ellas, lo que a su vez dependerá de su solubilidad.

Otro factor muy importante de estos sistemas bifásicos fue el hallazgo del distinto reparto que experimentan las sales tras su adición, ya que esto supondrá un reparto desigual lo que provocará que las fases se encuentren cargadas. Así

el ión fosfato se localiza preferentemente en la fase de Dextrano, cargándose negativamente, mientras que la fase de polietilenglicol presentará una carga positiva. Otro ión frecuentemente empleado es el ión cloruro, que se localiza preferentemente en el polietilenglicol, cargando a esta fase negativamente y por lo tanto adquiriendo la fase de Dextrano una carga positiva.

El conjunto de estos factores, caracter hidrófilo o hidrófobo de las soluciones de los polímeros, junto con la carga creada por los iones, son los factores que determinarán la mayor o menor carga de las fases del sistema. De aquí se deduce que la carga que presente una partícula, así como su solubilidad, condicionaran la afinidad por la fase de Dextrano o por la de polietilenglicol preferentemente. A su vez, considerando que esta carga superficial de una partícula depende de la composición de la membrana, partículas que difieran en los componentes de las membranas son susceptibles de separarse por estos sistemas bifásicos.

Otro aspecto de estos sistemas, es la gran simplicidad y rapidez de los mismos, lo que supone una escasa manipulación, que junto con las condiciones suaves empleadas, mantienen la integridad de las partículas a lo largo del proceso.

El empleo de sistemas bifásicos, creados por Dextrano y polietilenglicol han sido empleados satisfactoriamente para la separación y aislamiento de partículas subcelulares como mitocondrias y cloroplastos (Albertsson, 1971; Gardeström y cols., 1978; Larsson y col., 1971; Larsson y Andersson, 1979 ;

Albertsson y col., 1980) llegando a obtenerse en el caso de mitocondrias de hojas una integridad y pureza superior a la encontrada en fracciones aisladas por técnicas de centrifugación.

5.3.2.- Caracterización de mitocondrias libres y sinaptosomas aislados por bifase

a) Actividades enzimáticas

Comparando los valores de las AEE de diversos enzimas, en la fracción de mitocondria libre aislada por las distintas técnicas desarrolladas a lo largo de la Tesis (Tabla XLV) se pone de manifiesto la alta pureza alcanzada en la fracción aislada por bifase, deduciéndose asimismo la capacidad de purificación de esta técnica, siendo especialmente llamativo con la actividad lactato deshidrogenasa ya que de los 377 nmol/min/mg descritos para esta fracción aislada por sacarosa se pasa a 14 nmol/min/mg tras el empleo de bifase, asimismo se reducen notablemente la AEE de acetil colinesterasa, pasando de los 30 nmol/min/mg en sacarosa o de los 50 de Ficoll 3 - 6 % a 11 nmol/min/mg para bifase, estos datos seleccionan a la técnica de los sistemas bifásicos como la más eficaz para la obtención de fracciones mitocondriales con un alto grado de pureza. El rendimiento en proteína mitocondrial es del 0,53 %, siendo el más bajo de los distintos métodos empleados (Tabla XLV).

b) Ensayos respiratorios de mitocondrias aislados por bifase

La simplicidad del método del sistema bifásico suponía que se mantendría una buena integridad de los orgánu

TABLA XLV

TABLA RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS DE MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS POR DISTINTOS METODOS.

	Sacarosa	Ficol 3-6 %	Ficoll 7,5-10%	Bifase
Lactato des- hidrogenasa con tritón	377 \pm 27 (3)	164 \pm 27,5 (5)	43 \pm 20 (11)	14 \pm 6 (2)
Acetil col- nesterasa	30 \pm 38 (3)	50 \pm 0,9 (5)	20 \pm 7 (11)	11 \pm 1 (2)
Citrato sin- tasa	1381 \pm 0 (1)	720 \pm 190 (2)	856 \pm 246 (8)	633,5 \pm 45,5 (2)
Rendimiento	0,73 %	1,1 %	1,17 %	0,53 %
Duración del proceso en horas	4,5	2	2	3

Los resultados estan expresados en nmol/min/mg.

los, dato que fue comprobado por su capacidad respiratoria frente a distintos sustratos oxidables (Tabla XLII), los valores de la razón RCR en presencia de succinato, piruvato más malato y glutamato más malato son de tres, significando un buen acoplamiento por efecto del ADP. No obstante, el índice más representativo de la integridad funcional viene determinado por el índice P:O, alcanzando un valor de 2,4 y 2,8 para glutamato y piruvato en la presencia de malato y de 1,8 para succinato, deduciéndose que esta fracción mitocondrial posee una buena actividad metabólica.

Cuando se modificaron las concentraciones de potasio del medio de incubación se apreció un ligero estímulo de los RCR en el medio 100 mM potasio con succinato y glutamato más malato, siendo este incremento una propiedad típica de las mitocondrias de cerebro. No obstante en el caso de piruvato más malato se produjo una disminución de este cociente.

Comparando los valores respiratorios en mitocondrias libres aisladas por los diferentes métodos empleados a lo largo de esta Tesis (Tabla XLVI), se aprecia que los RCR más bajos corresponden a las fracciones aisladas por sacarosa, mostrando bajo acoplamiento por efecto del ADP, excepto para succinato. En las fracciones aisladas por bifase se encuentran valores de RCR semejantes a los de fracciones obtenidas por gradientes discontinuos de Ficoll. De estos resultados se desprende que la mitocondria aislada por bifase posee una alta pureza con una buena capacidad respiratoria y por lo tanto con gran actividad metabólica.

TABLA XLVI

PARAMETROS RESPIRATORIOS DE MITOCONDRIAS LIBRES AISLADAS POR DISTINTOS METODOS.

	Sacarosa		Ficoll 7,5-10 %		Bifase	
	Estado III	RCR	Estado III	RCR	Estado III	RCR
Piruvato 5 mM + malato 2,5mM	206	1,54	157,3	3,95	70	3,0
Succinato 10 mM	266	1,9	113,3	3,17	118,0	3,4
Glutamato 5 mM + malato 2,5mM	148	1,7	60,3	2,58	59,0	3,4

Los resultados estan expresados en natomos O_2 /min/
mg y corresponden a ensayos realizados con medio 100 mM K^+

c) Microscopía electrónica

La confirmación de la pureza de la fracción de mitocondrias se ha obtenido del análisis realizado por microscopía electrónica. Las fotografías correspondientes a secciones de mitocondrias muestran una ausencia total de otro tipo de partículas, excluyendo así la contaminación de sinaptosomas. El otro aspecto de interés es la alta integridad de los orgánulos, no existiendo fragmentos en la preparación, sino mitocondrias perfectamente limitadas por sus membranas. De los dos tamaños de mitocondrias aparecidos, se podría sugerir que se deben a mitocondrias en distinto estado funcional, o bien que correspondan a mitocondrias hinchadas (las de mayor tamaño) pudiendo ser causado durante el proceso de preparación de las muestras para su examen microscópico. A su vez la fracción de sinaptosomas muestra una preparación con gran pureza, no habiéndose encontrado mitocondrias libres en la misma. La integridad de los sinaptosomas está preservada, no existiendo fragmentos y mostrando todos los componentes típicos de la terminación nerviosa. Otro dato que confirma la bondad de las preparaciones de las partículas aisladas por bifase, es la presencia en determinados sinaptosomas de la membrana postsináptica, encontrándose completa la sinápsis con todos sus componentes.

5.4.- Mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradientes discontinuos de Ficoll y purificadas por bifase

5.4.1.- Determinaciones enzimáticas

Las fracciones mitocondriales aisladas por gradientes discontinuos de Ficoll se sometieron a Bifase. De los ensayos enzimáticos realizados se ha comprobado una vez más la disminución en las actividades enzimáticas marcadoras de contaminantes. Este aspecto resulta de gran interés ya que el rendimiento en proteína mitocondrial con el empleo de gradientes de Ficoll es el más elevado de los métodos empleados, siendo de gran utilidad la bifase para efectuar una posterior purificación de estas fracciones rindiéndonos de esta manera una fracción muy pura y a su vez con suficiente material para poder realizar distintos ensayos metabólicos. Este aspecto cobra gran interés en la fracción de mitocondrias sinápticas, donde el mayor rendimiento se obtiene con el empleo de gradientes de Ficoll, pero su nivel de contaminación suele ser ligeramente superior al de mitocondrias libres.

A su vez, se ha encontrado una gran similitud en los valores enzimáticos estudiados en la fracción de mitocondrias libres en ratas de 18 días y en adultas. No obstante, en la fracción de mitocondrias sinápticas a los 18 días han aparecido una disminución importante en las actividades citocromo c oxidasa y citrato sintasa, sugiriendo que en este periodo no estarían totalmente formadas y desarrolladas todas las terminaciones nerviosas, aspecto que estaría a su vez relacionado con una maduración incompleta de todos los componentes de la misma, afectando

tando por lo tanto a la mitocondria sináptica.

5.4.2.- Incorporación de ^{14}C leucina

Varios aspectos han aparecido de interés. Por una parte el incremento de la incorporación de las mitocondrias purificadas por bifase respecto a las no purificadas, sugiriendo que la mayor pureza de estas fracciones, supone una eliminación de proteína no mitocondrial que produce un aumento en la radioactividad específica, siendo muy importante este factor en la fracción de mitocondrias sinápticas donde el incremento ha sido de 44,2 %.

Comparando los resultados encontrados en el periodo de 18 días con el adulto, se ha apreciado un ligero aumento en la fracción de mitocondrias libres frente a ratas adultas, dato descrito por Guiffrida y Gadaleta (1978), quien observó una mayor incorporación en periodo neonatal.

Por último, en la fracción de mitocondrias sinápticas procedentes de ratas de 18 días de vida, se ha encontrado junto con el descenso en la incorporación, una disminución en las actividades enzimáticas citrato sintasa y citocromo c oxidasa, que sugieren una incompleta maduración de la mitocondria sináptica en dicho periodo.

201

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.- El empleo de gradientes de sacarosa permite separar dos poblaciones de mitocondrias, libres y sinápticas, sin contaminación con microsomas, con discreta actividad respiratoria y ligera contaminación con sinaptosomas. Las mitocondrias libres y sinápticas muestran espectros semejantes de citocromos, pero el contenido de RNA y DNA es mayor en las primeras.
- 2.- Los cortes de cerebro presentan baja actividad en la incorporación de leucina tritiada en mitocondrias aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa, lo que sugiere un daño irreversible del tejido durante el proceso.
- 3.- La leucina tritiada, administrada intraventricularmente, se incorpora en mitocondrias libres y sinápticas aisladas por gradiente de sacarosa con diferente comportamiento en ambas poblaciones. En las mitocondrias libres aparece un máximo de incorporación a las 13,3 h., mientras que en las sinápticas aparecen dos a las 3 y 22 h., y un mínimo a las 13,3 h.
- 4.- Los resultados de incorporación de leucina se interpretan por la llegada a la terminación sináptica de material no marcado, y altamente marcado, en periodos sucesivos y mediante transporte axoplásmico. Tal interpretación se corrobora por experimentos de pulso-caza y por administración intraventricular de colchicina.

- 5.- La incorporación "in vivo" de leucina tritiada en mitocondrias libres y sinápticas es más sensible a la cicloheximida que al cloranfenicol, cuando se administra por vía intraperitoneal. Ambos antibióticos, y en particular, el cloranfenicol, producen una fuerte inhibición cuando se administran por vía intraventricular.
- 6.- Las mitocondrias, obtenidas por el método de Clark y Nicklas, tienen una cierta contaminación con sinaptosomas, e incorporan leucina tritiada "in vitro" en un proceso muy inhibido por el cloranfenicol e insensible a la cicloheximida.
- 7.- El empleo de gradientes discontinuos de Ficoll permite obtener mitocondrias libres y sinápticas, con menor contaminación con sinaptosomas que las de sacarosa y poseen una alta funcionalidad respiratoria. El Mg^{++} produce una disminución de la razón de control respiratorio, excepto cuando el succinato es usado como sustrato.
- 8.- Ambas poblaciones incorporan leucina tritiada y ^{14}C -leucina "in vitro" en un proceso inhibido por el cloranfenicol, insensible a cicloheximida y estimulado por el Mg^{++} . La incorporación es lineal durante los primeros 45 minutos y los valores medios obtenidos son ligeramente más altos en mitocondrias libres.
- 9.- Los experimentos realizados con ^{14}C -leucina ofrecen una mayor reproducibilidad y más alta actividad específica de incorporación. La contaminación bacteriana no excede en estos experimentos de 300 colonias/ml.

- 10.- La incorporación "in vitro" es mayor en mitocondrias incubadas con una fuente exógena de ATP - consistente en ATP, fosfoenolpiruvato y piruvatoquinasa - que en mitocondrias en estado IV de respiración. El estado III, inducido por ADP, aumenta la incorporación "in vitro". Los mejores resultados se consiguen en presencia de malato, glutamato y ADP.
- 11.- El dinitrofenol, el fenobarbital y la hormona tiroidea T_3 disminuyen la incorporación "in vitro" de ^{14}C -leucina por mitocondrias libres y sinápticas.
- 12.- La incorporación "in vitro" de ^{14}C -leucina por mitocondrias, obtenidas de ratas de 18 días, es claramente inferior respecto a las adultas en el caso de mitocondrias sinápticas, no observándose diferencias significativas en las libres.
- 13.- La tireclectomía, efectuada en ratas de 13 días y sacrificadas a los 18, no ofrece alteraciones significativas en la capacidad de incorporación "in vitro" de ^{14}C -leucina.
- 14.- Las mitocondrias logradas por partición en bifase demuestran un mayor grado de purificación por criterios enzimáticos. La microscopía electrónica corrobora la preparación de mitocondrias intactas, y carentes de contaminación de sinaptosomas, respiratoriamente muy activas y con razones de ADP/O próximas a las teóricas.

- 15.- Las mitocondrias libres y sinápticas, aisladas por gradientes discontinuos de Ficoll y repurificadas por bifase, muestran una escasa actividad de enzimas sinaptosomales e incorporan "in vitro" ^{14}C -leucina, en presencia de fuente exógena de ATP, con la mayor actividad específica de todas las preparaciones ensayadas.

205 bis

206

7.- BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

- ABDEL LATIF A.A. (1966), Biochim. Biophys. Acta, 121, 403.
- ABOOD L.G. (1970), Brain mitochondria in Lajtha A. Ed., Hand-
book of neurochemistry, vol 2, 303. New York, Plenum .
- ALBERTSSON P.A., Andersson B., Larsson C., y Akerlund H.E.
(1980), en "Methods of Biochemical Analysis (D.Glick ed.),
vol 28, Wiley-Interscience, New York, in press.
- ALBERTSSON P.A., (1971), Partition of Cell Particles and Macro
molecules, Wiley, New York.
- APPEL S.H., Autilio L., Festoff B.W., y Escueta A.V. (1969),
J. Biol. Chem. 244, 3166.
- ASHWELL M. y Work T.S. (1970), Ann. Rev. Biochem. 39, 251, 290
- ATTARDI G. y Attardi B. (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61,
261.
- AUGUSTINE E.C. y Hymer W.C. (1978), Mol. Cell. Endocrinol. 10,
225, 238.
- AUSTIN L., Morgan I.G. (1967), J. Neurochem. 14, 377.
- AUSTIN L., Morgan I.G. y Bray J.J. (1970), en "Protein metabo-
lism of the Nervous System", ed. A. Lajtha (Plenum Press, New
york), p. 271.
- AUSTIN L., Bray J.J. y Young R.J. (1966), J. Neurochem 13, 1267
- AUTILIO-GAMBETTI L., Gambetti P. y Shafer B. (1973), Brain Res.
53, 387.
- AUTILIO L., Appel S.H., Pettis P., Gambetti P.L. (1968), Bio-
chem. 7, 2615.

- AVADHANI N.G. y Buetow D.E. (1972 b), Biochem. J. 128, 353.
- AVADHANI N.G. y Buetow D.E. (1972 a), Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 773.
- AVADHANI N.G., Lewis F.S. y Rutman R.J. (1974), Sub. Cell. Biochem. 4, 93, 145.
- BACHELARD H.S. (1966), Biochem. J. 100, 131.
- BACHELARD H.S., Campbell W.J. y Mc Ilwain H. (1962), Biochem. J. 84, 225.
- BALFOUR D.J.K y Gilbert J.C. (1970), Biochem. Pharmacol. 20, 1151.
- BANKS P., Mayor D., Mitchell M. y Tomlinson O. (1971), J. Physiol. 216, 625.
- BARONDES S. (1973), Neuronal Proteins: Synthesis, Transport and Neuronal regulation. En Schneider D.J., Angeletti R.H., Bradjshaw R.A., Grasso A. and Moore B.W. (eds.), Proteins of the nervous system. New York: Raven.
- BARONDES S.H. (1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 147.
- BARONDES S.H. (1968) J. Neurochem. 15, 343.
- BARONDES S.H. (1964), Science 146, 779.
- BEATTIE D.S. (1979). En "Yeast versus mammalian mitochondrial protein synthesis. Methods in Enzymology", vol LVI, 17.
- BEATTIE D.S. e Ibrahim N.G. (1973), Biochem. 12, 176.
- BEATTIE D.S., Basford R.E. y Koritz S.B. (1967 b), Biochem. 6, 3099.
- BEATTIE D.S., Basford R.E. y Koritz S.B. (1967 a), J. Biol. Chem. 242, 20, 4584.

- BEATTIE D.S., Basford R.E. y Koritz S.B. (1967 c), J. Biol. Chem. 242, 14, 3366.
- BEAUFAY H. y Berthet J. (1963). Biochem. Soc. Symp. 23, 66.
- BEAUFAY H., Jacques P., Baudhium P., Sellinger O.Z., Berthet J., y Deduve C. (1964), Biochem. J. 92, 184.
- BERNARD P.A. y Cockrell R.S. (1979), Biochim. Biophys. Acta 548, 173.
- BLOKHUIS G.G.D. y Veldstra H. (1970), FEBS Let. 11, 197.
- BONDY S. (1971), Exp. Brain Res. 13, 135.
- BOOTH F.W. y Hollosky J.O. (1975), Arch. Biochem. Biophys. 167, 674.
- BOOTH R.F.G. y Clark J.B. (1978), Biochem. J. 176, 365.
- BORST P., Loos J.A., Christ E.J. y Slater E.C. (1962), Biochim. Biophys. Acta 62, 509.
- BORST P. (1972), Annu. Rev. Biochem. 41, 333.
- BOSMANN H.B. (1972), J. Neurochem. 19, 763.
- BOSMANN H.B. y Hemsworth B.A. (1970), J. Biol. Chem. 245, 363.
- BRADFORD H.F. (1967), Abstracts of the first international congress of the International Society of Neurochemistry. Strasburg p. 30.
- BRADFORD H.F. (1968), "Carbohydrate and Energy metabolism" in Davison A.N. and Dobbing J. (Eds.) Applied Neurochemistry. Philadelphia, Davis.
- BRADFORD H.F. (1969), J. Neurochem. 16, 675.
- BRADFORD H.F. (1970 a) Brain Res. 19, 239.

- BRADFORD H.F. (1970 b), Biochem. J. 117, 36.
- BRADFORD H.F. (1971), Membrane potenciales and metabolic performance in mammalian synaptosomes in Cellular Organules and membranes in Mentol Retardation, (P.F. Benson ed.) London, Churchill Livingstone.
- BRADFORD H.F., Bennett G.W. y Thomas A.J. (1973), J. Neurochem. 21, 495.
- BREGA A. y Baglioni C. (1971), Eur. J. Biochem. 22, 415.
- BRIDGERS W.F., Cunningham R.D. y Gresset G. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 2, 351.
- BUNN C.N., Mitchell C.H., Lukins H.B. y Linnane A.W. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 67, 1233.
- BURTON K. (1956), Biochem. J. 62, 315.
- CAMPBELL M.K., Mahler H.R., Moore W.J. y Tewari S. (1966), Biochem. 5, 1174.
- CARTLEDGE T.G. y Lloyd D. (1972), Biochem. J. 126, 381.
- CASOLA L., Davis G.A. y Davis R.E. (1969), J. Neurochem. 16, 1037.
- CHANCE B. y Williams G.R. (1956), Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 17, 65.
- CHERMAT C. y Simon J. (1975), J. Pharmac. (Paris) 6, 489.
- CH'IH J.J., Froman P.A. y Devlin T.M. (1978), Proceedings of the Society for experimental biology and medicine 159, 288.
- CH'IH J.J., Procyk R. y Devlin T.M. (1977), Biochem. J. 162 501.

- CH'IH J.J., Olszyna D.M. y Devlin T.M. (1976), Biochem. Pharmacol. 25, 2407.
- CLARK-WALTER G.D. y Linnane A.W. (1966), Biochim. Biophys. Res. Commun. 25, 8.
- CLARK-WALTER G.D. y Linnane A. W. (1967), J. Cell. Biol. 34, 1.
- CLARK J.B. y Land J.M. (1974), Biochem. J. 140, 25.
- CLARK J.B. y Nicklas W.J. (1970), J. Biol. Chem. 245, 4724.
- COHEN M.M. y Hartmann J.F. (1964), Biochemical and ultrastructural correlates of cerebral cortex slices metabolizing in vitro. In Cohen M.M. and Snider K.S. (Eds.), Morphological and Biochemical correlates of neural activity, Harper and Row, New York, p. 57.
- COOPER C.S. y Avers C.J. (1974), Evidence of involvement of mitochondrial polysomes and messenger RNA in synthesis of organelle proteins. En "The biogenesis of mitochondria". (Kroon A. M. y Saccone C., Eds.), p. 289. New York - London: Academic Press
- COOTE J.L. y Work T.S. (1971), Eur. J. Biochem. 23, 564.
- COTMAN C.W. y Taylor D.A. (1971), Brain Res. 29, 366.
- COTMAN C.W. y Mathews D.A. (1971), Biochim. Biophys. Acta 249, 380.
- COTMAN C., Herschman H., y Taylor D. (1971), J. Neurobiol. 2, 169.
- COTTER D.A., Miura-Santo L.Y., y Hoyl H.R. (1969), J. Bact. 100, 1020.
- CRISTENSEN H.N. (1972), Nature and Roles of receptor sites for aminoacid transport. En Ebadi M.S. and Costa E. (Eds.) "Advances in Biochemical Psychopharmacology" Vol 4, New York: Raven.

- CUNNINGHAM R.D. y Bridgers W.F. (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 99.
- DAHLSTROM A. (1968), Eur. J. Pharmacol. 5, 11.
- DASKA T., Merski J., Hughes J.B. y Busch H. (1975), Exp. Cell. Res. 93, 395.
- DEANIN G.G., Gordon M.W. (1973), J. Neurochem. 20, 55.
- DE BELLEROCHE J.S. y Bradford H.F. (1972 a), J. Neurochem. 19, 385.
- DE BELLEROCHE J.S. y Bradford H.F. (1972 b), J. Neurochem. 19, 585.
- DE BELLEROCHE J.S., Bradford H.F. y Jones D.G. (1975), J. Neurochem. 22, 680.
- DE BELLEROCHE J.S. y Bradford H.F. (1975), Biochem. Soc. Trans. 3, 372.
- DE DUVE C. (1971), J. Cell. Biol. 50, 20D.
- DE ROBERTIS E., Pellegrino de Iraldi A., Rodríguez de Lores Arnaiz G., y Salganicoff L. (1962), J. Neurochem. 9, 23.
- DIAMOND I., y Fishman R.A. (1973), Nature 243, 519.
- DIENEL G., Ryder E. y Greengard O. (1977), Biochim. Biophys. Acta 496, 484.
- DIMINO M.J., y Hoch F.L. (1972), J. Bioenergetics 3, 525.
- DISCHE Z. (1955), "Color Reactions of Nucleic Acid Components in The nucleic Acids". Vol 1. Chargoff and Davidson Eds. Acad. Press. New York, 285 p.
- DIXON H., Kellerman G.M., Mitchell C.H., Towers N.H. y Linnae A.W. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 780.

- DUNN A. (1971), Brain Research 35, 254.
- DUTTON G.R., Haywood P. y Barondes S.H. (1973), Brain Res. 57, 397.
- EBNER E., Menucci L. y Schatz G. (1973), J. Biol. Chem. 248, 5360.
- ELIMAN G.L., Courtney K.D., Andress V. Jr. y Featherstone R.M. (1961), Biochem. Pharmacol. 7, 88.
- EVANS D.A. y Lloyd D. (1967), Biochem. J. 103, 22.
- FEIT H., Dutton G.R., Barondes S.H. y Shelanski M.L. (1971), J. Cell. Biol. 51, 138.
- FELDMAN F., y Mahler H.R. (1974), J. Biol. Chem. 249, 3702.
- FERNANDEZ H.L., Hunneus F.C. y Davison P.F. (1970), J. Neurobiol. 1, 395.
- FERNANDEZ H.L., Burton P.R. y Samson F.E. (1971), J. Cell. Biol. 51, 176.
- FESTOFF B.W., Appel S.H. y Day E. (1971), J. Neurochem. 18, 1871
- FIBIGER H., Pudritz R.C., Mc Greer E.G. (1972), J. Neurochem. 19, 1697.
- FIRKIN F.C. y Linnane A.W. (1968), Biochem. Biophys, Res. Commun. 32, 398.
- FIRKIN F.C. y Linnane A.W. (1969), Exp. Cell. Res. 55, 68.
- FLEXNER C.B. (1955), en "Biochemistry of the Developing Nervous System" (Wacissh H. Ed.) p. 281. Academic Press, New York.
- FRIEDE R.L. (1969), J. Neurochem. 4, 101.

- GADALETA M.N., Barletta A., Caldarazzo M., De Leo T. y Saccone H.C. (1972), Eur. J. Biochem. 30, 376.
- GADALETA M.N., Greco M. Del Prete G. y Saccone C. (1976), Arch. Biochem. Biophys. 172, 238.
- GALPER J.B. y Darnell J.E. (1971), J. Mol. Biol. 57, 363.
- GAMBETTI P., Autilio-Gambetti L.A., Gonatas N.K. y Shafer B. (1972), J. Cell. Biol. 52, 526.
- GARDSSTRÖM P., Ericson I. y Larsson C. (1978). Plant. Sci. Lett. 13, 231.
- GAVARET J.M., Vilkki P., y Rall J.E. (1979), FEBS Let. 108, 1, 40.
- GAYET J. y Durand M. (1977), En "Mechanisms Regulation and special functions of protein synthesis in the brain". Eds. Roberts et al. Elsevier. North Holland. Biomedical Press.
- GFELLER E., Kuhar M.J. y Snyder S.H. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1, 155.
- GILBERT J.M. (1972), J. Biol. Chem. 247, 6451.
- GIUFFRIDA A.M. y Gadaleta M.N. (1978), Bull. Mol. Biol. Med. vol 3, suppl. 1, 69_s.
- GLOWINSKI J. e Iversen L.L. (1966), Biochem. Pharmacol. 15, 977.
- GOLDBERG M.A. (1971), Brain Res. 27, 319.
- GORDON M.W. y Deanin G.G. (1968), J. Biol. Chem. 243, 4222.
- GORNALL A.G., Bardawill C.S., David M.M. (1939), J. Biol. Chem. 177, 751.
- GRAFSTEIN B. (1971), Science 172, 1777.

- GRAFSTEIN B. (1969), Axonal transport: Communication between soma and synapse. En Costa E. and Greengard P. (Eds.), Advances in Biochemical Psychopharmacology. Vol 1. New York: Raven, p. 11.
- GRAY E.G. y Whittaker V.P. (1960), J. Physiol. 163, 35.
- GRAY E.G. y Whittaker V.P. (1962), J. Anat. Lond. 96, 79.
- GREEN et al. (1955), J. Biol. Chem. 217, 551.
- GREGSON N.A. y Williams P.L. (1969), J. Neurochem. 16, 617.
- GROOT G.S.P., Kovac L. y Schatz G. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 68, 308.
- GURD J.W. (1978), Brain Res. 147, 201.
- HALDAR D. (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 129.
- HARRIS E.J., Cockrell R. y Pressman B.C. (1966), Biochem. J. 99, 200.
- HAWLEY E.S. y Greenawalt J.W. (1970), J. Biol. Chem. 245, 3574.
- HENN F.A., Anderson D.J., y Rustad D.G. (1976), Brain Res. 101 341.
- HENSON C.P., Perlman D., Weber C.N. y Mahler H.R. (1968), Biochem. 7, 4445.
- HERNANDEZ A.G., Suarez G., Roman H. y Dawidowicz K. (1978), Exp. Brain Res. 33, 325.
- HERNANDEZ A., Burdett L. y Work T.S. (1971), Biochem. J. 124, 327.
- HERNANDEZ A.G., Langford G.M., Martínez J.L. y Dowdal M.J. (1976), Acta Cient. Venezolana 27, 120.

- HO K., YAMAMOTO I. y LO H.H. (1975), Eur. J. Pharmac. 30, 164,
- HORN A.S., COYLE J.T. y SNYDER S.H. (1971), Mol. Pharmacol. 7, 66.
- HUANG C., Wheeldon L. y Thompson T.E. (1964), J. Molec. Biol. 8, 148.
- HUNGEN K.V., Mahler M.R. y Moore W.J. (1968), J. Biol. Chem. 243, 7, 1415.
- IBATA I., Piccoli F., Pappas G.D. y Lajtha A. (1971), Brain Res. 30, 137.
- IBRAHIM N.G., Burke J.P. y Beattie D.S. (1974), J. Biol. Chem. 249, 6806.
- ISMAIL-BEIGI F. y Edelman I.S. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1071.
- ITOH N., Kawasaki T. y Yamashina I. (1974), J. Biochem. 76, 459.
- JEFFREY P.L. y Austin L. (1973), Prog. Neurobiol. 2, 205.
- JEFFREY P.L., James K.A.C., Kidman A.D., Richards A.M. y Austin L. (1972), J. Neurobiol. 3, 199.
- JÖBSIS F.F. (1963), Biochim. Biophys. Acta 74, 60.
- JOHNSTON N.L. y Larramendi L.M.H. (1968), Exp. Brain. Res. 5, 326.
- JONES C.T. y Banks P. (1970), Biochem. J. 118, 791,
- JONES D.A. y Mc Ilwain H. (1971), J. Neurochem. 18, 41.
- JONES L.R., Mahler H.R. y Moore W.J. (1975), J. Biol. Chem. 250, 3, 973.

- KADENBACH B. (1966), Biochim. Biophys. Acta 134, 430.
- KALF G.F. (1963), Arch. Biochem. Biophys. 101, 350.
- KANNENGIESSER H.H., Hunt P. y Raynaud J.P. (1973), Biochem. Pharmacol. 22, 73.
- KARLSSON J.O e Isostrand J. (1971), J. Neurochem. 18, 2209.
- KEESEY J.C., Wallgren H. y Mc Ilwain H. (1965), Biochem. J. 95, 289.
- KELLEMS R.E., Allison V.F. y Butow R.A. (1974), J. Biol. Chem. 249, 3297.
- KELLEMS R.E. y Butow R.A. (1974), J. Biol. Chem. 249, 3304.
- KELLEMS R.E. y Butow R.A. (1972), J. Biol. Chem. 247, 8043.
- KEYHANI E. (1973), J. Cell. Biol. 58, 480.
- KHAN A.A. y Wilson J.E. (1965), J. Neurochem. 12, 81.
- KINI M.M. y Quastel J.H. (1959), Nature, 184, 252.
- KLEE C.B. y Sokoloff L. (1964), J. Neurochem. 11, 709.
- KLEE C.B. y Sokoloff L. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1014.
- KORNGUTH S.E., Anderson J.W. y Scott G. (1969), J. Neurochem. 16, 1017.
- KORNGUTH S.E., Flancas A.L., Siegel F.L., Geison R.L., O'Brien J.F., Lamar C. Jr. y Scott G. (1971), J. Biol. Chem. 246, 1177.
- KREUTZBERG G.W. (1969), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 722.
- KRISTENSSON K., Olsson Y. y Sjostrand J. (1971), Brain Res. 32, 399.

- KROON A.M. (1963), Biochim. Biophys. Acta, 72, 391.
- KROON A.M. y Jansen R.J. (1968), Biochim. Biophys. Acta 155, 629.
- KUHLMAN R.E. y Lowry O.H. (1956), J. Neurochem. 1, 173.
- KUROKAWA M., Sakamoto T. y Kato M. (1965), Biochem. J. 97, 833.
- LAHIRI S. y Lajtha A. (1964), J. Neurochem. 11, 77.
- LAI J.C.K., Walsh J.M., Dennis S.C. y Clark J.B. (1977), Neurochem. J. 28, 625.
- LAI J.C.K., y Clark J.B. (1976), Biochem. J. 154, 423.
- LAMB A.J., Clark-Walker G.D., y Linnane A.W. (1968), Biochim. Biophys. Acta 161, 415.
- LANSMAN R.A., Rowe J. y Woodward D.O. (1974), Eur. J. Biochem. 41, 15.
- LARRY R., Mahler H.R. y Moore W.J. (1975), J. Biol. Chem. 250, 3, 973.
- LARSSON C. y Andersson B. (1979), En Plant Organelles, Methodological surveys (b), vol 9, (Ed. Reid E.), Ellis Horwood, Chichester p. 35.
- LARSSON C., Collin C. y Albertsson P.A. (1971), Biochim. Biophys. Acta 245, 425.
- LASEK R.J. (1970), Int. Rev. Neurobiol. 13, 289.
- LASTHA A. y Toth J. (1966), Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 294.
- LA VAIL J.H. y La Vail H.M. (1972), Science 176, 1416.
- LEDERMAN M. y Attardi G. (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1492.

- LEDERMAN M. y Attardi G. (1973), J. Molec. Biol. 78, 275.
- LEHNINGER A.L. (1970), Biochemistry. New York, Worth p. 267,564.
- LEVITAN I.B., Mushynski E. y Ramirez G. (1972), J. Biol. Chem. 247, 17, 5376.
- LE WALLEN C.G., Rall J.E. y Bermman M. (1959), J. Clin. Invest. 38, 88.
- LIBERMAN U.A., Asano Y., Lo C.S. y Edelman I.S. (1979), Biophys. J. 27, 127.
- LINN T.C., Pettit F.H., Hucho F. y Reed L.J. (1969), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 227.
- LINNANE A.W. y Haslam J.M. (1970), Curr. Top. Cell. Reg. 2, 101.
- LOWRY O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265.
- LUBINSKA L. (1975), Int. Rev. Neurobiol. 17, 241.
- LUSENA C.V. y Depocas F. (1966), Can. J. Biochem. 44, 497.
- LUSENA C.V. (1965), Can. J. Biochem. 43, 1787.
- MAHLER H.R., Dawidowicz K., y Feldman F. (1972), J. Biol. Chem. 247, 7439.
- MAHLER H.R. y Dawidowicz K. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 70, 111.
- MARINARI U.M., Morgan I.G., Mack G. y Gombos G. (1972), Neurobiology 2, 176.
- MARTIAL J.A., Baxter J.D., Goodman H.M. y Seeburg P.H. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1816.
- MARTIN S.S. y Bosmann H.B. (1971), Exp. Cell. Res. 66, 59.

- MASON T.L., Poyton R.O., Wharton D.C. y Schatz G. (1973), J. Biol. Chem. 248, 1346.
- MC EWEN B. y Grafstein B. (1968), J. Cell. Biol. 38, 494.
- MC EWEN B.S., Forman D.S. y Grafstein B. (1971), J. Neurobiol. 2, 361.
- MC ILWAIN H. y Bachelard H.S. (1971 a), Biochemistry and the Central Nervous System. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 1.
- MC ILWAIN H. y Bachelard H.S. (1971 b), Biochemistry and the Central Nervous System, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 68.
- MC ILWAIN H. (1951), Biochem. J. 49, 382.
- MC ILWAIN H., Woodman K.J. y Cummins J.T. (1961), Biochem. J. 81, 79.
- MC ILWAIN H. (1963), Chemical exploration of the brain, Elsevier, Amsterdam, p. 1.
- MC LEAN J.R., Cohn G.L., Brandt I.K. y Simpson M.V. (1958), J. Biol.Chem. 233, 657.
- MITCHELL C.H., Buan C.C., Lukins H.B. y Linnane A.W. (1973), J. Bioenerg. 4, 161.
- MICHEL R. y Neupert W. (1973), Eur. J. Biochem. 36, 53.
- MOCKEL J.J. y Beattie D.S. (1975), Arch. Biochem. Biophys. 167, 301.
- MOKRASCH L.C. (1966), J. Neurochem. 13, 49.
- MOORE C.L. y Jöbsis F.F. (1970), Arch. Biochem. Biophys. 138, 295.
- MORELIS R., Broquet P., y Louisot P. (1974), Biochim. Biophys. Acta 373, 10.

- MORGAN I.G. y Austin L. (1968), J. Neurochem. 15, 41.
- MORGAN I. G. y Austin L. (1969), J. Neurobiol. 1, 155.
- MORGAN I.G. (1970), FEBS Let. 10, 4, 273.
- MORGAN I.G., Reith M., Marinari V., Breckenridge W.C. y Gombos G. (1972), Glycolipides, Glycoproteins and Mucopolysaccharides of the Nervous system. Ed. Zambotti V., Tettamanti, 209. New York: Plenum.
- MUGNAINI E. y Walberg F. (1964), Ergeb. Anat. Entwicklung. 37, 194.
- MULDER A.H., Geuze J.J. y Wied D. (1970), Endocrinology 87, 61.
- MURAMATSU M., Shimada N. y Higshinakawa T. (1970), J. Mol. Biol. 53, 91.
- NEUPERT W., Brdiczka D. y Bücher Th. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 488.
- OCHS S. (1972), Science 176, 252.
- O'FARRELL P.H. (1975), J. Biol. Chem. 250, 4007.
- OJALA D. y Attardi G. (1972), J. Mol. Biol. 65, 273.
- OPPENHEIMER J.H., Silva E., Schwartz H.L. y Surks M.Ī. (1977) J. Clin. Invest. 59, 517.
- OZAWA K., Seta K., Araki H. y Handa M. (1967), J. Biochem. (Tokyo) 61, 352.
- OZAWA K., Seta K., Takeda H., Ando K., Handa H. y Araki C. (1966), J. Biochem. (Tokyo) 59, 501.
- PALAY S.L. y Palade G.E. (1955), J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 69.

- PETERSON R.P., Juwitez R.M. y Lindsay R. (1967), Exp. Brain. Res. 4, 138.
- PETERSON J.A., Bray J.J. y Austin L. (1968), J. Neurochem. 15, 741.
- PICKETT C.B., Cascárano J., y Johnson R. (1977), Journal of Bioenergetics and Biomembranes 9, 271.
- PIHA R.S., Cuenod M. y Waelisch H. (1966), J. Biol. Chem. 241, 2397.
- PITTMAN D. (1959), Cytologia 24, 315.
- POYTON R.O. y Schatz G. (1975 b), J. Biol. Chem. 250, 752.
- POYTON R.O. y Schatz G. (1975 a), J. Biol. Chem. 250, 762.
- PRINGLE J.R. (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 46.
- PYSH J.J. (1970), Brain Res. 18, 325.
- PYSH J.J. y Khan T. (1972), Brain Res. 36, 1.
- RABINOVITZ Ya. M., Pinus H.A. y Kotelnikova A.V. (1977), Mol. Cell. Biochem. 14, 1-3, 109.
- RAKER E. (1950), Biochim. Biophys. Acta 4, 211.
- RALL J.E. (1977), en "The Thyroid (Werner S. and Ingbar S. Eds) p. 138. Academic Press, New York.
- RAMIREZ G. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 2, 452.
- RAMIREZ G., Levitan I.B. y Mushinski W.E. (1972), J. Biol. Chem. 247, 17, 5382.
- REITH M., Morgan I.G., Gombos G., Breckenridge W.C. y Wincendon G. (1972), Neurobiology, 2, 169.
- RICHTER D. (1965), Brit. Med. Bull, 21, 76.

- ROBERTS S. y Morelos B.S. (1965), J. Neurochem. 12, 373.
- RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ G., Albericida Canal M. y De Robertis E. (1971), Brain Res. 31, 179.
- ROODYN D.B., Reis P.J. y Work T.S. (1961), Biochem. J. 80, 9.
- ROODYN D.B., Freedman K.B., y Tata J.R. (1965), Biochem. J. 94, 628.
- ROODYN D.B. (1962), Biochem. J. 85, 177.
- ROTH S., Mc Guire E.J. y Roseman S. (1971), J. Cell. Biol. 51, 536.
- ROTH-SCHECHTER B.F., Winterith M., Tholey G., Dierich A. y Mandel P. (1979), J. Neurochem. 33, 669.
- SAGER R. (1972), Cytoplasmic genes and organelles. New York London, Academic Press.
- SAMSON F.E. Jr., Balfour W.M. y Jacobs R.J. (1960) Am. J. Physiol. 199, 693.
- SAMSON F.E. Jr. y Quinn D.J. (1967), J. Neurochem. 14, 421.
- SAMUELS H.H. y Shapiro L.E. (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 3369.
- SATAV G.J., Katyare S.S., Fatterpaker P. y Sreenivasan A. (1977), Eur. J. Biochem. 73, 287.
- SCHAPIRO G., Kruh J., Dreyfus J.C., Schapira F. (1960), J. Biol. Chem. 235, 1738.
- SCHATZ J.H. (1980), Investigación y ciencia, Julio, p. 100.
- SCHATZ G. (1968), J. Biol. Chem. 243, 2192.
- SCHATZ G. y Mason T.L. (1974), Ann. Rev. Biochem. 43, 51.

- SCHATZ G., y Saltzgaber J. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 996.
- SCHATZ G., Groot G.S.P., Mason T., Rouslin W., Wharton D.C. y Saltzgaber J. (1972), Fed. Proc. 31, 21.
- SCHATZ G. (1970), en: "Membranes of mitochondria and chloroplast (Racker E. Ed.) p. 251. Van Nostrand Rheinhold Co, New York.
- SCHNEIDER W.C. (1957), Methods in Enzymology, vol. III, p. 680.
- SCHUBERT P., Lux H.D. y Kreutzberg G.W. (1971), Acta Neurophat. Suppl. V, 179.
- SHANON C., Enns R., Wheelis L., Burchiel K. y Criddle R.S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3004.
- SHAPIRO A.L., Viñuelas E. y Maizel J.V. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815.
- SHARPLESS S.K. (1970), Hypnotics and sedatives. I. The barbiturates in the Pharmacologic Basis of Therapeutics (Goodman I.S. & Gilman A. Eds.) 4th Edn. p 98. Memillan, London.
- SHERMAN F., Slonimski P.P. (1964). Biochim. Biophys. Acta 90, 1.
- SIDNEY R. (1971), Handbook in Neurochemistry. Metabolic turnover in the Nervous System. (Lajtha A. Ed.) vol V, Plenum Press, New York, London.
- SIEGEL G.N., Alberr R.W., Katzman R. y Agranoff B.W. (1976), Cellular and subcellular fractionation. En Basic Neurochem. 2nd Ed., Appel S.H. and Day E.D. (Eds.), Little Brown & Company, Boston p. 34.

- SLATER E.C. (1973), Mitochondrial cytochromes b and their possible role in energy consevation. En, Mechanism in bioenergetics (Azzne G.F., Ernstter L., Papa S., Quagliariello E. y Siliprandi N. Eds.) p. 405, New York, London. Academic Press.
- SO A.G. y Davie E.W. (1968), Biochem. 2, 132.
- SOTELO C. y Palay S.L. (1968), J. Cell. Biol. 36, 151.
- SPERK G. y Baldessarini R.I. (1977), Neurochem. J. 28, 1403.
- SUBIK J., Kuzela S., Kolarov J., Kovac L. y Lachowicz T.M. (1970), Biochim. Biophys. Acta 205, 513.
- TATA J.R. y Widnell C.C. (1966), Biochem. J. 98, 604.
- TEDESCHI H. (1976), Mitochondria: Structure, Biogenesis and Transducing. Functions. En: Protein synthesis. Alfert M., Beerman W., Rudkin G., Sandritter W. and Sitte P. Eds.)p. 56, vol. 4. Springer-Verlag, Wien, New York.
- TENNYSON V.M. (1970), J. Cell. Biol. 44, 62.
- TEWARI S., Dufrebeck, N.B., Ross-Duggan J. y Noble E.P. (1978), Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 22, 2, 385.
- THOMAS D. y Williamson D.H. (1971), Nature N.B. 233, 196.
- THORNBURG J.E., y Moore K.E. (1973), Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 5, 81.
- TORACK R.M., Dufty M.L. y Haynes J.H. (1965), Z. Zellforsch, 66, 690.
- TUNRI ARI, Piha Sakari (1975), Finn. Chem. Lett. (3-4), 108.
- TURNER G.C. (1973), Eur. J. Biochem. 40, 201.
- TZAGOLOFF A. y Akai A. (1972), J. Biol. Chem. 247, 6517.

- TZAGOLOFF A., Akai A. y Sierra M.F. (1972), J. Biol. Chem. 247, 6511.
- TZAGOLOFF A., Rubin M.S. y Sierra M.F. (1973), Biochim. Biophys. Acta 301, 71.
- TZAGOLOFF A., Akai A. y Rubin M.S. (1974), Mitochondrial products of yeast ATPase and cytochrome oxidase. En, The biogenesis of Mitochondria. (Kroon A.M. and C. Sacocone, Eds.), p. 405. New York, London, Academic Press.
- TZAGOLOFF A. (1974), Ann. N.Y. Acad. Sci. 227, 521.
- TZAGOLOFF A. (1969), J. Biol. Chem. 244, 5027.
- TZAGOLOFF A. y Meagher P. (1972), J. Biol. Chem. 247, 594.
- TZAGOLOFF A. (1970), Curr. Top. Membr. Transp. 2, 157.
- VERITY M.A. (1972), J. Neurochem. 19, 1305.
- VERITY M.A., Brown W.J., Cheun M., y Czer G. (1977).
- VIGNAIS P.V., Stevens B.J., Huet J., y Andre J. (1972), J. Cell. Biol. 54, 468.
- WADE L.A. y Katzman R. (1975), Am. J. Physiol. 228, 352.
- WANKO T., Tower D.B. (1964), Combined morphological and biochemical studies of incubated slices of cerebral cortex. En: Cohen M.M. and Snider R.S. (Eds). Morphological and Biochemical correlates of Neural Activity, Harper and Row, New York p. 75.
- WATIAUX R., Wataux-De Coninck S. y Ronveaux-Dupal M.F. (1971), Eur. J. Biochem. 22, 31.
- WEBER K. y Osborn M. (1969), J. Biol. Chem. 244, 4406.

- WEINER N. (1960), J. Neurochem. 6, 79.
- WEISLOGEL P.O. y Butow R.A. (1971), J. Biol. Chem. 246, 5113.
- WERNER S. (1974 a), Eur. J. Biochem. 43, 39.
- WERNER S. (1974 b); Antibodies to subunits of cytochrome c oxidase and their relation to precursor proteins of the enzyme. En: The biogenesis of mitochondria (Kroon A.M. and Saccone C. Eds). New York, London, Academic Press.
- WHITE F.P., Mc Bride J., Mahler H.R. y Moore W.J. (1972), J. Biol. Chem. 247, 4, 1247.
- WHITE T.D. y Keen P. (1971), Mol. Pharmacol. 7, 40.
- WHITTAKER V.P. (1969 a) Handbook of Neurochemistry, Ed. A. Lajtha 2, 231, New York, Plenum.
- WHITTAKER V.P. (1969), Prog. Brain Res. 31, 211.
- WHITTAKER V. P. y Danks S.M. (1978) En Mitochondria: Structure, function and assembly (Phillips I.D.J., Ed.), Longman, London y New York, p. 113.
- WHITTAKER V.P. (1960), Regional Neurochemistry: The Regional Chemistry, Physiology and Pharmacology of the Central Nervous System. Proc. 4th int. Neurochem. Symp. Varena, p. 259, Ed. Kety S.S. & Elkes J., London, Pergamon Press LTD.
- WIELAND O. y Siess E. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 947.
- WIKSTRÖM, M.K.F. (1973). Biochim. Biophys. Acta 301, 155.
- WINZLER R.J. (1970), Int. Rev. Cytol. 29, 77.
- WOLBURG H. (1972), Exp. Brain Res. 15, 348.

- YELLIN T.O., Butler J. y Stein H.H. (1967), Federation Proc. 26, 833.
- YUDILEVICH D.L., De Rose N. y Sepulveda F.V. (1972), Brain Res 44, 569.
- ZATZ M. y Barondes S.H. (1971), J. Neurochem. 18, 1125.

